Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik der
Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F. R. C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Veränderungen von Serum- Testosteron und GSI-Werten nach HCG-Stimulation und PMS-Vorbehandlung in männlichen Ratten während der geschlechtlichen Reife

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
HUBERT BUCHER
aus Lindau (Bodensee)

1984

Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik der
Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F. R. C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Veränderungen von Serum- Testosteron und GSI-Werten nach HCG-Stimulation und PMS-Vorbehandlung in männlichen Ratten während der geschlechtlichen Reife

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
HUBERT BUCHER
aus Lindau (Bodensee)

1984

Dekan:	Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Gupta
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. M. B. Ranke

---

gedruckt bei H.-J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

INHALTSANGABE

I. Einleitung

II. Versuchstiere und Materialien

III. Methode

IV. Ergebnisse

V. Diskussion

VI. Zusammenfassung

VII. Literaturliste

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547617_0010

I. EINLEITUNG

Es wurden zur Erforschung der ursächlichen, auslösenden Faktoren für das Ingangkommen der sexuellen Reifungsprozesse von vielen Forschern Untersuchungen angestellt. Aber es hat sich bis heute kein ganz klares Bild darüber ergeben, was sich im Verlauf dieser Reifungsprozesse abspielt. Es scheint so zu sein, daß im Bereich der ZNS - Hypothalamus- Hypophysen - Gonaden - Achse ein jeder dieser Abschnitte als einer der ursächlichen Faktoren für den Beginn der Pubertät in Frage kommt, wobei es zu dynamischen Änderungen - im Sinne eines Schlüsselkonzeptes, welches als "Hypothese der unterschiedlichen Empfindlichkeit" bezeichnet wird - innerhalb dieser Achse kommt.

So müssen folgende Möglichkeiten in Betracht gezogen werden:

1. Im Bereich extrahypothalamischer ZNS - Arreale werden hemmende oder stimulierende Impulse auf die Hypothalamus - Zentren freigesetzt und dadurch die Gonadotropin - Releasing - Hormon Freisetzung beeinflußt.

2. Im Hypothalamus - Bereich wird durch Sensibilitätsabnahme gegenüber hemmenden Impulsen durch Sexualhormone (Steroide) vermehrt Releasing - Hormon (LHRH) freigesetzt, welches die gesteigerte Gonadotropin-Freisetzung (LH und FSH) auslöst. (4,7,9 22,25,26,27,30)

3. Im Hypophysen - Bereich wird infolge einer veränderten Ansprechbarkeit auf Releasing - Hormon vermehrt LH und FSH sezerniert.

4. Im Gonaden - Bereich kommt es durch eine Sensibilitätsänderung bezüglich der gonadotropen Hormone zur gesteigerten Sexualhormon - Produktion. (7,19,23,24,25)

5. Im Bereich der akzessorischen Sexualorgane kommt es zur Sensibilitätszunahme bezüglich Gonadenhormonen.

6. Im Bereich der Leber kommt es aufgrund der höheren Plasma - Testosteron-Spiegel zu einer direkten Hemmung der Produktion von sexualhormonbindendem Globulin (SHBG), wodurch vermehrt "freies Hormon" zur Verfügung steht, zusätzlich nimmt die Bindungsaffinität des SHBG ab. (10,40)

Beim Ingangsetzen der Pubertät scheinen mehrere dieser Mechanismen und deren Zusammenwirken eine wesentliche Rolle zu spielen, deren Endsumme sich in einer erhöhten gonadalen (und adrenalen) Steroid - Sekretion auszeichnet. Zusätzlich müssen noch andere Faktoren in Betracht gezogen werden, die aufgrund der Beeinflussung der testikulären androgenen Sekretion eine ätiologische Rolle in der sexuellen Reifung spielen. So nimmt die Prolaktinkonzentration in der männlichen Ratte in dem Maße zu, als sexuelle Reifung erreicht wird; es wurde nachgewiesen, daß Prolaktin bei der testikulären Sekretion von Testosteron von Wichtigkeit ist, und daß es die adrenale Androgensekretion in der männlichen Ratte verändert. (24)

Frühere Untersuchungen von Gupta konzentrierten sich sowohl auf die Hypothalamus - und Hypophysengebiete, wobei ein Unterschied in der negativen Rückkopplungsempfindlichkeit aufgezeigt wurde, als auch auf den LHRH - Einfluß auf den Hypophysenbereich, dessen Sekretionsempfindlichkeit bezüglich LH - und FSH Freisetzung mit Einsetzen der Pubertät zunimmt.

In der vorliegenden Untersuchung ging es um Punkt 4 der oben dargestellten Übersicht, nämlich um die veränderte Antwort des Hodens auf HCG - Stimulation in Abhängigkeit von der sexuellen Reife. Dem vorausgegangen waren die Beobachtungen, daß die peripheren LH - Konzentrationen während der sexuellen Reifung in der männlichen Ratte nicht besonders zunahmen und die FSH - Konzentrationen im Laufe des Reifungsprozesses sogar abfielen. (4,14,25) Daher muß angenommen werden, daß sich, bei nicht fortlaufender Zunahme der Gonadotropinkonzentrationen während des Reifungsprozesses, die Empfindlichkeit der Gonaden auf Gonadotropine ändert.

Zur Untersuchung dieser Vorgänge wurde HCG und PMS an männlichen Wistar - Ratten unterschiedlichen Alters verabreicht. HCG, welches als Präparat Primogynol ^{R} vorlag und aus dem Harn schwangerer Frauen stammt, hat eine ähnliche Wirkung wie ICSH = LH. HCG bedingt, über das im Hoden als Mittlersubstanz tätige zyklische 3'5' - Adenosinmonophosphat (3'5'AMP), (40) eine Zunahme folgender Enzymaktivitäten in den Leydig - Zell - Mikrosomen und in den Samenkanälchen (vor allem bei unreifen Ratten, s. Abb. a und b): Desmolase, 3ß - Hydroxysteroid - Dehydrogenase,

Δ^4-5α - Reduktase. (11,21,34,35) Shoen und Samuels (35) berichteten weiterhin, daß HCG die Zahl der Leydig - Zellen erhöht; ebenso ist bekannt, daß die HCG - Langzeitverabreichung von histologischen Veränderungen in den Leydig - Zellen begleitet ist und zusätzlich die 17α - Hydroxylaseaktivität erhöht (34), während eine einzige HCG - Verabreichung die 17α - Hydroxylaseaktivität erniedrigte, bei gleichzeitiger Plasma - Testosteron Zunahme. (14) Die 20α-Hydroxysteroid - Dehydrogenaseaktivität nahm nach 5 Tagen HCG - Stimulation jedoch leicht ab (34), da es möglich ist, daß ICSH (oder HCG) die 20α - Hydroxysteroid - Dehydrogenase hemmt, was eine erhöhte Verstoffwechselung des Progesterons durch 17α -Hydroxylase zur Folge hat. (21) Andere Literaturquellen berichten jedoch, daß ICSH in erster Linie eine 20α - Hydroxylierung des Cholesterins bewirkt und damit eine Zunahme der Testosteronvorstufen erreicht wird. (40) Ebenso wird über eine beträchtliche 17 ß - Hydroxysteroid - Dehydrogenasenaktivität infolge HCG - Applikation berichtet (35,37), sowie auch von einer Zunahme des Seitenketten abspaltenden Enzyms von Cholesterol (11) und einer 3α - Hydroxysteroid - Dehydrogenasenaktivitätszunahme nach LH - Behandlung bei reifen Ratten. (21)

Die zweite Substanz, die verabreicht wurde, war PMS, welches als Präparat Anteron^R vorlag und aus dem Serum trächtiger Stuten gewonnen wird. Es besitzt sowohl FSH - als auch ICSH = LH - Wirkung. FSH wirkt vorwiegend auf die tubuli seminiferi, wo es offenbar zur Stimulierung der letzten Stufen der Spermiogenese notwendig ist. Andererseits wird aber auch berichtet, daß die erhöhten FSH - Spiegel bei der unreifen Ratte den Beginn des spermatogenetischen Prozesses beinhalten, mit der Teilung von Gonocyten, um Spermatogonien zu bilden. (15)

Es kommt aber auch bei lokaler Verabfolgung eines FSH - reichen Präparates tierexperimentell zu einer sekretorischen Hypertrophie der Sertolischen Stützzellen (40), in denen FSH die Bildung eines Bindungsproteins = "Rezeptor" = BP stimuliert, mittels dessen Testosteron durch die "Blut - Hoden - Schranke" transportiert werden kann. (36) Weiterhin wird berichtet, daß mit ständiger FSH - Exposition der Leydigzellen die Empfindlichkeit für LH zunimmt. (4,7,24,25) Berichtet wird auch von einer Zunahme der 5α - Reduktasenaktivität des gesamten Hodens bei 28 tägigen hypophy-

sektomierten Ratten. (21) Krause und Schwaebe zeigen hingegen auf, daß PMS eine ähnliche Wirkung wie HCG haben soll. (13)

In der vorliegenden Arbeit sollte anhand des peripheren Serum - Testosteron - Spiegels die Beeinflussung des Hodens durch HCG, mit und ohne vorhergehende PMS - Stimulation, während des Reifungsprozesses in der männlichen Ratte untersucht werden. Die Muster der Steroide, die von den Hoden sezerniert werden, haben gezeigt, daß sie sich während der Reifung verändern. (24) Durch den Verlauf der Brüche von A-Diol/Testo und DHT/Testo über die verschiedenen Entwicklungsstadien ergibt sich, daß zu Beginn der Pubertät eine Zunahme der 5α - Reduktase stattfindet. (10) So war auch bei Moger der A-Diol/T+DHT - Bruch für die Altersperiode von 20-35 Tagen signifikant größer als bei den anderen Altersstufen. (20) Das bedeutet, daß bei unreifen Ratten die Bildung von 5 α A-Diol extrem schnell verläuft, während nur wenig Testosteron angehäuft wurde. Jedoch wurde zum Zeitpunkt der Pubertät Testosteron zum Hauptprodukt und die Bildung von 5-α-A-Diol wurde stark reduziert. (21) Es waren daher Anstiege von 5α -reduzierten Metaboliten in sexuell unreifen Ratten hoch, also in einem Alter, in dem die Testosteron - Produktion minimal war, wohingegen der umgekehrte Sachverhalt für erwachsene männliche Ratten gefunden wurde. (3)

Pubertät muß als Zeitperiode definiert werden, in welcher Gonaden und solche Organe wie Prostata und Samenbläschen plötzlich groß werden. (6) Zu diesem Zeitpunkt tritt in zunehmenden Konzentrationen DHT auf, welches ein brauchbarer Parameter für die Beurteilung des Ablaufes der Geschlechtsreife darstellt. (40) Testosteron und DHT können nicht ohne weiteres so betrachtet werden, daß sie die gleichen Potenzen in allen Zielgeweben haben. (20) So muß in der Prostata Testosteron zuerst in das wirksame DHT reduziert werden, welches dann einen hyperplasiogenen Effekt ausübt, während 5α A-Diol für die metabolische Wirkung verantwortlich zu sein scheint. (40) Androgenrezeptor - Studien im unreifen Rattenhoden zeigten jedoch auf, daß DHT und Testosteron jeweils an selektive Cytoplasma - und Nuklear - Rezeptoren gebunden sind, was vermuten läßt, daß Testosteron und DHT beide aktive Androgene

im Hoden sind. In Suspensionen von Spermatocyten aus Rattenhoden wird Testosteron hauptsächlich in DHT umgewandelt, was vermuten läßt, daß DHT für den Hauptanteil der Androgenaktivität in diesen Zellen verantwortlich ist. (21) Neben der Differenzierung des äußeren Genitales beim Menschen durch DHT, bewirkt Testosteron u.a. noch die Entwicklung und Erhaltung des männlichen Behaarungstyps, Talgdrüsenfunktion (Akne), höhere muskuläre Leistungsfähigkeit (Körperbau), Libido - und Potenzförderung, Peniswachstum, Kehlkopfvergrößerung (Stimmbruch). (36,40)

Für 5 α A-Diol besteht die Möglichkeit, daß es einer der testikulären Komponenten in der Hypothalamus - Hypophysen - Gonaden - Achse in der unreifen Ratte ist. (20) Weiterhin scheint, daß neben anderen Androgenen vor allem das Testosteron von physiologischer Wichtigkeit in der Masculinisierung des männlichen Gehirns ist und demnach das männliche Sexualverhalten bedingt. (4,40)

In der vorliegenden Arbeit sollten neben den altersabhängigen, peripheren Testosteronveränderungen auf Gonadotropinstimulation auch dosisabhängige Veränderungen des Testosteron - Spiegels untersucht werden. Dazu wurden drei verschieden hohe HCG - Dosen verabreicht und zusätzlich noch die Beeinflussung der Hodenantwort auf PMS - Vorbehandlung geprüft. Daneben wurden noch die Veränderungen der Hodengewichte auf die erwähnten vorausgehenden Gonadotropinstimulationen bestimmt. Um eine Antwort auf diese Fragen zu erhalten, wurde folgendermaßen vorgegangen: HCG wurde in Dosen von 10, 20, 40 I.U./100 g Körpergewicht an präpubertäre (26 Tage), pubertäre (35, 45, 56 Tg) und erwachsene (65 und 76 Tg) männliche Ratten verabreicht. Einem Teil dieser Tiere wurde an zwei Tagen jeweils 10 I.U. PMS/100 g Körpergewicht appliziert, um sie am dritten Tag mit unterschiedlichen HCG - Dosen zu behandeln.

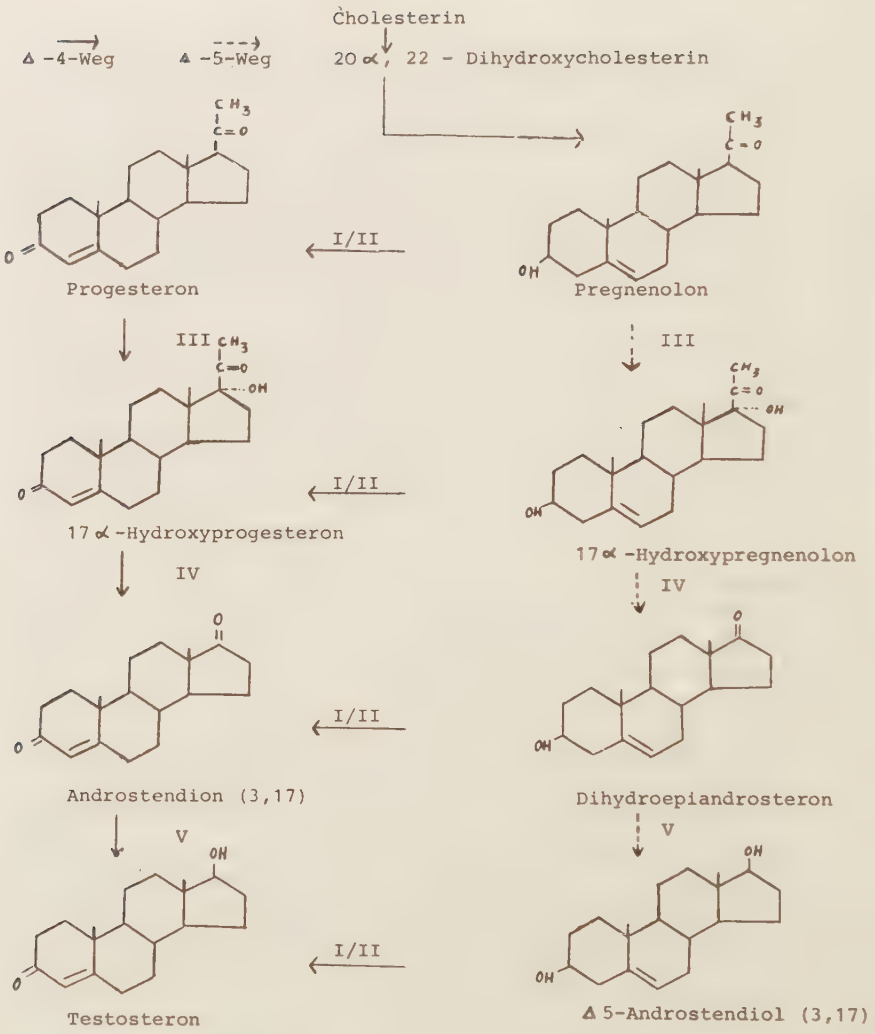


Abb. a: Testosteron-Biosynthese

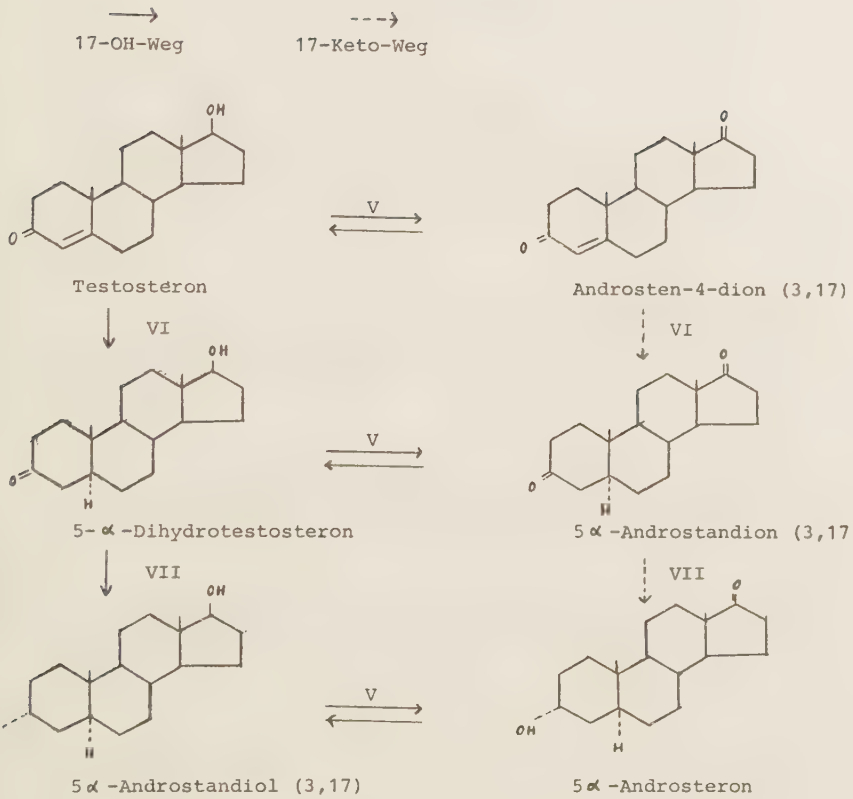


Abb. b: Testosteron-Abbau

I = 3 ß-Hydroxysteroid Dehydrogenase
II = 5-4 Isomerase
III = 17α-Hydroxylase
IV = Desmolase
V = 17 ß-Hydroxysteroid Dehydrogenase
VI = 5α-Reduktase
VII = 3α-Hydroxysteroid Dehydrogenase

II. VERSUCHSTIERE UND MATERIALIEN

II.1. Versuchstiere

Verwendet wurden 224 männliche Ratten vom Wistar-Stamm, die von der Zucht Ivanovas, Kißlegg/Allgäu, in sechs unterschiedlichen Altersstufen bezogen wurden. Die Tiere waren zu diesem Zeitpunkt genau sechs Tage jünger, als das vorgeschriebene, jeweilige Versuchsalter.

II.2. Radioaktive Substrate

Name	Abkürzung	Spez. Aktivität
Testosteron (1,2,6,7-3H(N))	T	85-105 Ci/mmol
Dihydrotestosteron (1,2-3H(N))	DHT	40-60 Ci/mmol
5α-Androstan-3α,17β-diol (1,2-3H(N))	A.-Diol	40-60 Ci/mmol

Sämtliche radioaktivmarkierten Steroide stammten von "New England Nuclear Chemicals GmbH" Dreieichenhain b. Ffm.

Alle radioaktiven Steroide wurden in einer Lösung Benzol:Äthanol= =9:1 Vol:Vol geliefert. Daraus wurden Stammlösungen (nach Verdampfen des obigen Gemisches und Wiederlösung in absol. Äthanol) hergestellt, aus der dann folgende Arbeitslösungen erstellt wurden:

a) 400 000 dpm/ml in absol.Äthanol, für radioaktive Wiederfindung ("recoveries").
b) 400 000 dpm/ml in 0,1%iger Gammaglobulin-Kochsalzlösung, für Radioimmunoassay.

Lagerung bei 4° C.

II.3. Kristalline Steroide

Die Standardsteroide Testosteron und 5α-DHT lieferte die "Fa. Merck", Darmstadt.

5α-Androstan-3α, 17β-diol wurde von der "SIGMA-Chemical-Company" bezogen.

Auch hiervon wurden Stammlösungen hergestellt, indem 1mg Hormonkristalle in 1ml absol.Äthanol gelöst wurden. Daraus wurden folgende Arbeitslösungen erstellt:
a) 1ng/ml in Äthanol, für Standardkurve bis 100 pg.
b) 10ng/ml in Äthanol, für Standardkurve ab 200 pg.

Lagerung bei 4° C.

II.4. Antiserum

Das Antiserum wurde von Prof. E. Nieschlag, Münster, zur Verfügung gestellt. Es wurde mit 0,1%iger Gammaglobulinlösung auf eine Arbeitskonzentration von 1:40 000 verdünnt und bei 4° C gelagert.

II.5. Weitere Reagenzien und Präparate

Für FSH (PMS) wurde das Präparat Anteron^{R}, für HCG das Präparat Primogonyl^{R}, beide von der "Fa. Schering", Berlin, verwendet.

Äthanol absol., Benzol, Cyclohexan, Dimethyl-POPOP (=$C_{26}H_{20}N_2O_2$), Essigsäureäthylester, Methanol, 1-n Natronlauge und Toluol stammten von der "Fa. Merck", Darmstadt, mit Reinheitsgrad "zur Analyse".

Den Diäthyläther lieferte die Universitätsapotheke Tübingen. Das Gammaglobulin war ein Produkt der "Fa. Sigma-Chemical" und trug die Bezeichnung "Bovine Cohn-Fraction II".

NaCl (0,9%) war vom "Biotest Serum Institut", Frankfurt, das PPO (2,5 Diphenyloxazol) von der "Fa. Packard Instruments-Company", Ffm., Norit A die Aktivkohle aus Holz von "Serva Feinbiochemica", Heidelberg, Sephadex LH 20 und Dextran T 70 lieferte "Pharmacia Fine Chemicals", Uppsala.

II.6. Glas- bzw. Plastikwaren

Bei der Säulenchromatographie kamen Büretten vom Typ Cr 11/10 der "Fa. Quickfit Laborglas GmbH", Wiesbaden, zum Einsatz, denen 100 ml-Vorratsgefäße vorgeschaltet wurden, indem deren Auslaufstutzen (mit Absperrhahn) in die obere Öffnung der Bürette ein-

gepaßt wurden. Weiter wurden mit Glasstöpseln verschließbare, 30 ml-Spitzgläser zur Extraktion und graduierte 12 ml-Fraktionssammelgläschen zur Elution benutzt. (Sämtliche Glaswaren wurden vor Gebrauch zusätzlich zweimal mit Methanol gespült).

Für den Radioimmunoassay wurden spitze Zentrifugengläschen aus Plastik verwendet; zum Messen der radioaktiven Proben Polyäthylengläschen, mit Schraubdeckelverschluß.

II.7. Meßgerät

Zur Messung der Radioaktivität in den einzelnen Proben wurde ein Liquid-Scintillation-Spectrometer, Modell Tricarb 2002, der "Fa. Packard" verwendet.

II.8. Ansätze von ständig verwendeten Lösungsgemischen

a) Essigsäureäthylester:Diäthyläther im Verhältnis 1:1 Vol:Vol. (Zur Extraktion).

b) Cyclohexan: Benzol :Methanol im Verhältnis 80:15:5 Vol:Vol:Vol. (Laufmittel zur Säulenchromatographie).

c) 1 g Sephadex LH 20 pro 4ml Laufmittel gelöst, ließ man über Nacht quellen. (Aufschwemmung zum Füllen der Bürette).

d) 0,1%ige Gammaglobulin-Kochsalzlösung:
500 mg Gammaglobulin gelöst in 500 ml 0,9%-iger NaCl. (Verwendet zum Radioimmunoassay). Lagerung bei 4° C.

e) Aktivkohle-Dextran-Gemisch:
500 mg Aktivkohle Norit A zusammen mit 500 mg Dextran T 70 in 200 ml 0,1%-iger Gammaglobulinlösung. (Verwendet beim Radioimmunoassay). Lagerung bei 4° C.

f) Szintillationsflüssigkeit:
12,5 g PPO-2,5-Diphenyloxazol und 250 mg Dimethyl-POPOP-1,4-bis-2(4-Methyl-5-Phenyloxazol)-benzol in 2,5 l Toluol.

III. METHODE

III.1. Behandlung und Gruppeneinteilung der Versuchstiere

III.1.1. Gruppenbildung

Aus der unterschiedlichen hormonellen Behandlung der Ratten ergab sich für jede Altersgruppe eine weitere Unterteilung in sieben Untergruppen wie folgt:

Untergruppen	Hormonelle Behandlung
a) Kontrolle	0,9%ige NaCl entsprechend den Injektionsmengen in den anderen Gruppen.
b) HCG-10-Dosis	1x100 I.U./kg Körpergew. Primogonyl^{R}
c) HCG-20-Dosis	1x200 I.U./kg " Primogonyl^{R}
d) HCG-40-Dosis	1x400 I.U./kg " Primogonyl^{R}
e) PMS-Dosis plus HCG-10-Dosis	1x100 I.U./kg " Anteron^{R} (1. Tag)
	1x100 I.U./kg " Anteron^{R} (2. Tag)
	1x100 I.U./kg " Primogonyl^{R} (3. Tag)
f) PMS-Dosis plus HCG-20-Dosis	1x100 I.U./kg " Anteron^{R} (1. Tag)
	1x100 I.U./kg " Anteron^{R} (2. Tag)
	1x200 I.U./kg " Primogonyl^{R} (3. Tag)
g) PMS-Dosis plus HCG-40-Dosis	1x100 I.U./kg " Anteron^{R} (1. Tag)
	1x100 I.U./kg " Anteron^{R} (2. Tag)
	1x400 I.U./kg " Primogonyl^{R} (3. Tag)

Bei den 26 und 35 Tage alten Ratten zählte jede Untergruppe acht Tiere; (also insgesamt bei diesen beiden Altersgruppen 2x56=112 Tiere). Bei den 45, 56, 65, 76 Tage alten Ratten umfaßte jede Untergruppe vier Tiere; (also insgesamt bei diesen vier Altersgruppen 4x28=112 Tiere).

III.1.2. Technische Details

a) Applikationsart : Intraperitoneal-Injektion (mit BCG-Spritze).

b) Applikationsmodus : Jede Altersgruppe erhielt die PMS-Dosen, bei den dafür vorgesehenen Untergruppen, jeweils an zwei Tagen vor Erreichen des angegebenen Alters. Die Untergruppen, welche nicht mit PMS vorbehandelt wurden, erhielten an diesen Tagen eine entsprechende Menge physiolog. NaCl-Lösung. Am Tage des angegebenen Alters wurden die unterschiedlichen HCG-Dosen verabreicht. Die jeweiligen Kontrollgruppen erhielten insgesamt dreimal 0,9%-ige NaCl. Durch diese NaCl-Injektionen wurde jede Ratte gleich oft gespritzt und war somit dem gleichen Injektionsstress ausgesetzt.

c) Ansätze der Injektionslösungen:

Anteron^{R}: Eine Ampulle enthielt 1000 I.U.; dazu wurden 10 ml 0,9%-ige NaCl gegeben, damit 0,1 ml = 10 I.U. entsprachen.

Primogonyl^{R}: Hier wurden folgende Lösungen hergestellt (mit 0,9%-iger NaCl):

0,1 ml = 10 I.U.
0,1 ml = 20 I.U.
0,1 ml = 50 I.U.

d) Haltung der Tiere: Bis zu Beginn des Versuches und während der gesamten Versuchsdauer wurden die Ratten unter gleichbleibenden Stallbedingungen (Futter=Altromin^{R}, Wasser, Licht, Temperatur) gehalten.

e) Entnahme von Blut und Testis:

Nachdem die Tiere die ihrem Gewicht entsprechenden Injektionen jeweils morgens erhielten, wurden sie neun Stunden nach der jeweiligen HCG-Applikation unter Chloroformnarkose dekapitiert. Das gesamte hab-

hafte Blut wurde gesammelt, wobei in den beiden jüngsten Altersgruppen das Blut jeweils zweier Tiere zusammen gesammelt wurde. Anschließend wurden die Hoden entnommen und gewogen. Die Blutproben wurden abgesert und in der Tiefkühltruhe (-10° C) bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

III.2. Bestimmung von Testosteron, 5α -DHT und 5α -Androstandiol im Serum

Dazu wurde folgendermaßen vorgegangen:

1) Extraktion der Steroide aus dem Serum.
2) Auftrennung (und Reinigung) durch Säulenchromatographie.
3) Quantitative Bestimmung der Steroidhormone mittels Radioimmunoassay (RIA).

III.2.1. Extraktion der Steroide aus dem Serum

Es wurden von jeder Ratte 1 ml Serum in ein nach unten konisch zulaufendes Reagenzglas pipettiert (Eppendorf-Pipetten). Dazu wurde anschließend 1 ml Aqua dest. gegeben.

Um später den Verlust, der auftritt durch Extraktion plus Säulenchromatographie, zu berechnen, wurden zu jeder Probe je 2000 dpm 3H-DHT, 3H-Testo, und 3H-A.-Diol dazupipettiert. Überdies wurden von jedem radioaktiv markierten Hormon 2000 dpm in je ein Plastikzählgläschen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und gemessen. Dies wurde bei der erwähnten Berechnung als der 100%-Wert der radioaktiven Wiederfindung angesehen.

Danach wurden die Proben zur Inkubation 20 Min. in einen Wärmeschrank (36° C) gestellt. Anschließend wurden 0,02 ml 1-n NaOH dazupipettiert; (Lösung der Proteinbindung der Hormone). Jetzt gab man zu jeder Probe 5 ml des Essigsäureäthylester-Äther-Gemisches und schüttelte dann alle Proben 30 min. lang, in horizontaler Lage, auf dem Rotamix, bei stärkster Einstellstufe. Nachdem

sich die wässerige Serumsphase gesetzt hatte, wurde die gesamte organische Phase in ein zweites Spitzglas pipettiert.

Jetzt wurden zu jedem Serumrückstand ein zweites Mal 5 ml des Extraktionsgemisches gegeben, und wiederum in der beschriebenen Weise 30 min. lang geschüttelt. Die organische Phase wurde abermals in das zweite Spitzglas pipettiert.

In dieses Glas mit der organischen Phase gab man jetzt 1 ml Aqua dest., schüttelte 1 Minute auf dem VORTEX-Mixer und pipettierte schließlich diese wässerige Phase mit Pasteur-Pipetten wieder ab. Damit wurden verbliebene wasserlösliche Substanzen aus der organischen Phase entfernt.

Anschließend wurden sämtliche organischen Phasen eingedampft. Kurz vor ihrem Gebrauch wurden die verwendeten Spitzgläser nochmals zweimal gründlichst mit Methanol gespült und anschließend getrocknet.

III.2.2. Auftrennung der Steroide durch Säulenchromatographie

III.2.2.1. Technische Vorbereitungen

Zunächst mußten die Büretten je zweimal mit Aqua dest., Methanol und Laufmittel gründlich gespült werden, bevor man sich an das "Gießen" der Säulen machte. Dazu wurde mit einer Pasteur-Pipette die Sephadex-LH 20-Aufschwemmung in die Bürette gebracht. Bei diesem Vorgang mußte der Auslaufhahn der Bürette geöffnet sein, um ein möglichst gleichmäßiges Aufschichten der Sephadex-Teilportionen zu einer Gesamtsäule zu erreichen. Weiterhin mußte darauf geachtet werden, daß während dieses "Schichtens" keine Lufteinschlüsse auftraten, und darauf, daß das Sephadex-Gel immer mit Laufmittel bedeckt war.

Wurde auf diese Weise eine Säulenhöhe von etwas mehr als 10 cm erreicht, setzte man der Bürette ein Vorratsgefäß mit 100 ml Laufmittel auf und spülte die Säule einen Tag mit diesem Gemisch. Im Laufe dieses Tages wurden die Säulen mehrmals auf eventuell aufgetretene Lufteinschlüsse kontrolliert und die exakte Säulenhöhe von 10 cm hergestellt.

III.2.2.2. Ermittlung des Elutionsdiagramms (s. Abb. 1)

War die Säule homogen, konnte sie am nächsten Tag benützt werden. Jetzt mußte die Trennfolge der einzelnen Steroidhormone und die Größe deren jeweiliger Fraktionen ermittelt werden. Man benützte dazu die markierten Hormone, indem man zuerst nur eines davon auf eine Säule auftrug. Jetzt wurde das Eluat in Milliliterfraktionen gesammelt und aus je einer solchen Fraktion 0,5 ml in je ein Zählröhrchen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit pipettiert und im Scintillation-Spectrometer gemessen. Mit den anderen zwei radioaktiven Hormonen wurde in gleicher Weise verfahren. Anschließend wurden dann zunächst zwei und schließlich alle drei radioaktiven Steroide auf eine Säule aufgetragen und in der beschriebenen Weise gesammelt und gemessen. Gab es, nach mehrmaligen Bestimmen des Elutionsdiagramms, zwischen den einzelnen Fraktionen keine wesentlichen Überschneidungen mehr, konnten die Sammelbereiche wie folgt festgelegt werden:

	Fraktion:	Hormon:
I	0-16 ml	--
II	16-22 ml	Dihydrotestosteron (6 ml)
III	22-23 ml	--
IV	23-33 ml	Testosteron (10 ml)
V	33-34 ml	--
VI	34-46 ml	Androstandiol (12 ml)

Die Fraktionen I, II und V wurden verworfen.

III.2.2.3. Simultane Auftrennung der drei Steroidhormone

Der eingedampfte Extrakt wurde in 0,2 ml Laufmittel gelöst und folgendermaßen auf die Säule aufgetragen:

Das Vorratsgefäß wurde abgenommen, das Laufmittel in der Bürette bis knapp unter die Geloberfläche abgelassen und dann sofort der Auslaufhahn geschlossen. Nun wurden unmittelbar darauf die 0,2 ml aus dem Extraktionsglas behutsam mit einer Eppendorf-Pipette auf die Geloberfläche gebracht. Anschließend wurde ein zweites Mal

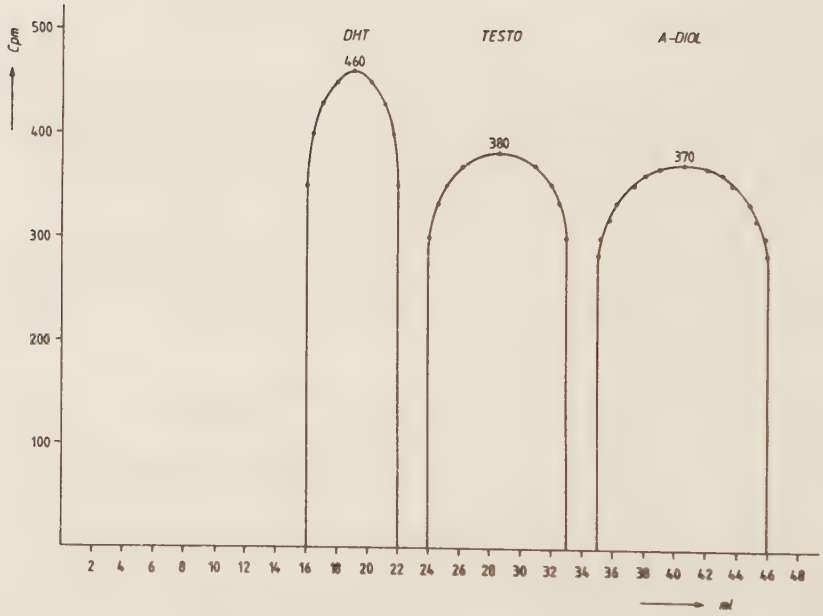


Abb. 1: Elutionsdiagramm

0,2 ml Laufmittel in das Extraktionsglas pipettiert und nach kurzem Schütteln auf dem VORTEX-Mixer in gleicher Weise auf die Geloberfläche aufgetragen. Jetzt wurde das erste graduierte Sammelgläschen unter den Bürettenauslauf geschoben und der Auslaufhahn geöffnet. Nachdem die aufgetragenen 0,4 ml Serumextraktlösung ebenfalls bis knapp unter die Geloberfläche abgesunken waren, wurde mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig Laufmittel über das Gel geschichtet, ohne dieses aufzuwirbeln. Dann wurde wieder das Vorratsgefäß vorgeschaltet und die Fraktionen in der angegebenen Weise gesammelt und danach evaporiert.

Mit einer Säulenfüllung konnten in der beschriebenen Art durchschnittlich sechs Trennungen durchgeführt werden. Zwischen zwei Probentrennungen mußte die Säule mit ca. 50 ml Laufmittel "gespült" werden.

III.2.3. Quantitative Bestimmung der Steroide mittels Radioimmunoassay (=RIA)

III.2.3.1. Prinzipielles über die radioimmunologische Methode

Zum Prinzip des RIA ist zu sagen, daß es sich hier um eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion handelt. Quantitativ meßbar wird diese Reaktion durch Isotopenmarkierung des sogenannten Antigens (=Steroidhormon).

$$\text{Reaktion I : Antikörper(=AK)} + \text{Hormon}^{+} \rightleftharpoons \text{AK-Hormon}^{+}$$

Das Hormon^{+} entspricht dem unmarkierten Hormon aus der Probe bzw. dem zur Erstellung der Standardkurve benützten Standardhormons, ist jedoch mit Tritium markiert. Dieses markierte Hormon^{+} hat die gleiche Affinität zu einem spezifisch bindenden Antikörper(AK), wie das unmarkierte Hormon.

$$\text{Reaktion II: Antikörper(=AK)} + \text{Hormon} \rightleftharpoons \text{AK-Hormon}$$

Wird nun in die Lösung in der die Reaktion I abläuft, zusätzlich unmarkiertes Hormon in unbekannter Menge oder als Standardmenge hinzugegeben, kommt es zu einer kompetitiven Hemmung zwischen dem AK und dem spezifischen radioaktiven Antigen durch das spezifische

nicht markierte Antigen. Je größer nun die Menge des unmarkierten Hormons ist, desto mehr wird der Tracer vom AK verdrängt und umso mehr läuft die Reaktion II ab, d.h., desto weniger werden die AK-Hormon$^+$-Komplexe. Auf diese Weise stellt die AK-Hormon$^+$-Menge, die nach Zugabe von unmarkiertem Hormon, bezogen auf die anfangs gegebene Hormon$^+$-Menge, verbleibt, ein ziemlich genaues Maß für die unbekannte Menge an endogenem Hormon der Plasmaprobe dar.

Durch Zugabe des Kohle-Dextran-Gemisches werden die freien markierten und unmarkierten Hormone, durch Adsorption an das Gemisch, von den an den AK gebundenen Hormonen(=Komplexe) getrennt und schließlich durch Zentrifugieren, die mit freien Hormonen beladenen Kohle-Dextran-Partikel im Bodensatz gesammelt. Schließlich wird die verbliebene Menge an AK-Hormon$^+$-Komplexen im Liquid-Scintillation-Spectrometer gemessen. Diese radioaktive Impulszahl kann nun über eine Standardkurve - die in entsprechender Weise mit bekannten Standardmengen aufgestellt wurde - in Relation zur unbekannten Menge in der Serumprobe gesetzt werden.

III.2.3.2. Vorbereitung für die Erstellung der Standardkurven

Damit die radioaktiven Zerfallszahlen, die sich beim Zählen der einzelnen Serumproben ergaben, in pg angegeben werden konnten, mußte für jedes Hormon eine Standardkurve aufgestellt werden. Es wurde dazu folgendermaßen vorgegangen:

Für jedes der drei Steroide wurden definierte Mengen des unmarkierten kristallinen Steroids, in folgender Reihe, in Plastikzentrifugengläschen pipettiert:

0 , 10 , 20 , 50 , 100 , 200 , 300 , 400 , 500 , 1000 , 2000 pg.

Dazu wurden die Arbeitslösungen die unter II.3. beschrieben sind, benützt.

Für den Totalwert wurde ein Gläschen leer gelassen.

Auch diese Standardreihe wurde pro Hormon in doppelter Ausführung vorbereitet, so daß insgesamt 2x11 Plastikzentrifugengläschen (incl. Gläschen für die Totalwerte) vorlagen. Diese Standardsteroidlösungen wurden anschließend durch die Zimmertemperatur eingedampft.

III.2.3.3. Vorbereitung der Serumhormonfraktionsproben für den RIA-Ansatz

Die Steroide der eingedampften Fraktionen (=drei Fraktionen pro Serumprobe) wurden durch Zugabe von je 1 ml Methanol und gründliches Schütteln auf dem VORTEX-Mixer in Lösung gebracht. Dieser Milliliter wurde in drei Teile unterteilt:

a) 0,2 ml (=20%) wurden zur Ermittlung der radioaktiven Wiederfindung (=recovery) in ein Plastikzählröhrchen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit pipettiert und im Liquid-Scintillation-Spectrometer gemessen.

b) 2 mal je 0,3 ml (je 33,33% = $\frac{3}{10}$ Vol) wurden in je ein Plastikzentrifugengläschen pipettiert und anschließend bei Zimmertemperatur verdampft. Diese beiden Gläschen waren für einen doppelten Ansatz zur quantitativen Bestimmung der Steroide mittels RIA vorgesehen.

III.2.3.4. Durchführung der radioimmunologischen Methode

Die evaporierten Standardkurvenproben, als auch die eingedampften Proben der Hormonfraktionen wurden gleichzeitig in der gleichen Art weiterverarbeitet.

Zunächst wurden in jedes Gläschen 0,5 ml Antikörperlösung pipettiert. Davon ausgenommen wurden jeweils die beiden Gläschen für die Totalwerte, in die stattdessen 0,5 ml 0,1%-ige Gammaglobulinlösung ohne Antikörper gegeben wurde.

Danach wurden alle Proben gründlich auf dem VORTEX-Mixer geschüttelt und 15 min. im Kühlraum (4° C) inkubiert. Überhaupt wurde mit der Zugabe des Antikörpers auch für die restlichen methodischen Schritte nur noch im Kühlraum gearbeitet; (Grund: Wärmeempfindlichkeit des Antiserums).

Als nächster Schritt wurden 0,5 ml der jeweiligen radioaktiv markierten Substanz in die Probengläschen und die Standardkurvengläschen, einschließlich Totalwertegläschen, pipettiert.

Dieser Ansatz wurde jetzt mindestens 12 Stunden im Kühlraum inkubiert.

III.2.3.5. Abtrennung des freien vom gebundenen Hormon

Nun wurden in jedes Röhrchen 0,2 ml des Kohle-Dextran-Gemisches dazugegeben. Ausnahme: Wiederum die Gläschen für die Totalwerte, in die eine gleiche Menge der 0,1%-igen Gammaglobulinlösung pipettiert wurde. Alle Proben wurden gründlich auf dem VORTEX-Mixer geschüttelt. Jetzt wurde 10 min. inkubiert, wobei das freie Steroid (sowohl radioaktiver Tracer, als auch nicht radioaktiv markiertes Steroid) an dieses Kohle-Dextran-Gemisch adsorbiert wurde.

Anschließend wurden alle Proben 20 min lang bei 2500 Upm. im Kühlraum zentrifugiert. Im Überstand war nun das antikörpergebundene Steroid; (sowohl markiertes, als auch nicht markiertes).

Aus jedem Gläschen wurden nun 0,5 ml dieses Überstandes abpipettiert und in ein Plastikzählgläschen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. Nachdem diese gut geschüttelt waren, ließ man sie über Nacht stehen, da sich Gammaglobulin mit der Szintillationsflüssigkeit nur langsam vermischt, und zählte sie danach im Liquid-Scintillations-Spectrometer 10 min.lang.

III.2.3.6. Erstellen der Standardkurven (s. Abb. 2 und 3)

Da von allen drei unmarkierten Referenzsteroiden ansteigende Mengen (von 0 bis 2000 pg) pipettiert wurden, fällt in dieser Richtung, nach den Gesetzen des RIA, die Anzahl der antikörpergebundenen, markierten Hormone. D.h.: Die gezählten Zerfälle pro 10 min. nehmen mit steigender Menge unmarkierten Hormones ab.

Diese Standardwerte wurden in Prozent der Gesamtradioaktivität = Totalwert = 100 % zum Ausdruck gebracht.

In der Standardkurve aufgetragen wurde also die definierte Menge unmarkierten Standardhormons gegen die prozentuale Bindung des markierten Hormons an den spezifischen Antikörper. Auf diese Weise kann bei gemessener Bindung des radioaktiven Steroids die Absolutmenge an entsprechendem Steroidhormon in einer Serumprobe abgelesen werden. Aus acht Standardkurven pro Hormon wurde rechnerisch die endgültige Standardkurve ermittelt. Für Testosteron wurde

diese endgültige Standardkurve ins logit-log-System übertragen. Folgende Formel wurde dazu verwendet:

$$\text{logit } y = \ln \frac{y}{100-y} \text{ , dabei ist } y = \frac{(B-N) \times 100}{(Bo - N)}$$

Bo = Wert bei O
N = USB = Wert bei 2000
B = entsprechende Countzahl

III.2.3.7. Berechnung der unbekannten Serumwerte

Hat man die pg-Menge aus der Standardkurve abgelesen, so erhält man die endgültige Hormonmenge pro 100 ml Serum durch folgende Formel:

$$\text{ng Hormon/100 ml Serum} = (X - L) \times \frac{10}{M \times R}$$

X = pg, abgelesen aus Standardkurve
L = Wasserleerwert
M = die zur Bestimmung benützte Menge in Prozent $\hat{=}$ 300 μl von 1 ml Serum
R = radioaktive Wiederfindung = Recovery

III.2.3.8. Recovery

Um zu ermitteln, wie hoch die Verlustrate der vor der Extraktion jeweils hinzupipettierten Radioaktivität durch Extraktion und Säulenchromatographie war, wurden aus jedem Fraktionseluat 20 % zur Messung abpipettiert.

Damit diese Werte als Korrekturfaktor in die erwähnte Formel zur endgültigen Berechnung der Hormonwerte im Serum mit einbezogen werden konnten, mußte vorausgesetzt werden, daß sich die radioaktiv markierten Hormone bezüglich der Extraktion und der Säulenchromatographie ebenso verhielten, wie die Serumsteroide.

Recoverywerte (%) :	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
Dihydrotestosteron :	45,18 ± 0,57
Testosteron :	67,91 ± 0,67
Androstandiol :	73,78 ± 0,67

III.2.3.9. Leerwerte und Testseren

Verbliebene Serumreste und Rückstände von Lösungsmitteln können die zu messenden Hormonwerte dadurch fälschen, daß sie mit dem zu messenden Steroid oder mit dem Antikörper reagieren. Daher wurde anstelle des Serums die gleiche Menge Wasser genommen und verfahrenstechnisch wie dieses behandelt. Diese sogenannten Wasserleerwerte wurden ebenso als Korrekturfaktor der in der Standardkurve abgelesenen Werte benutzt. Es wurde pro Altersgruppe ein Leerwert mitbestimmt.

Ebenso wurde pro Altersgruppe ein definiertes "Testserum" mitbestimmt, welches folgendermaßen zusammengesetzt war:

2 ml Aqua dest. + je 200 pg von jedem unmarkierten Standardsteroid.

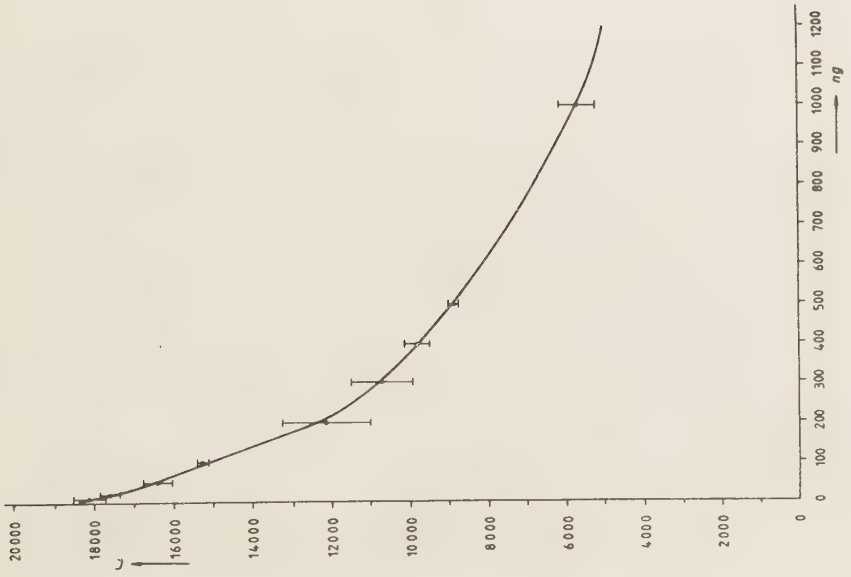


Abb. 2: Standardkurven für Testosteron

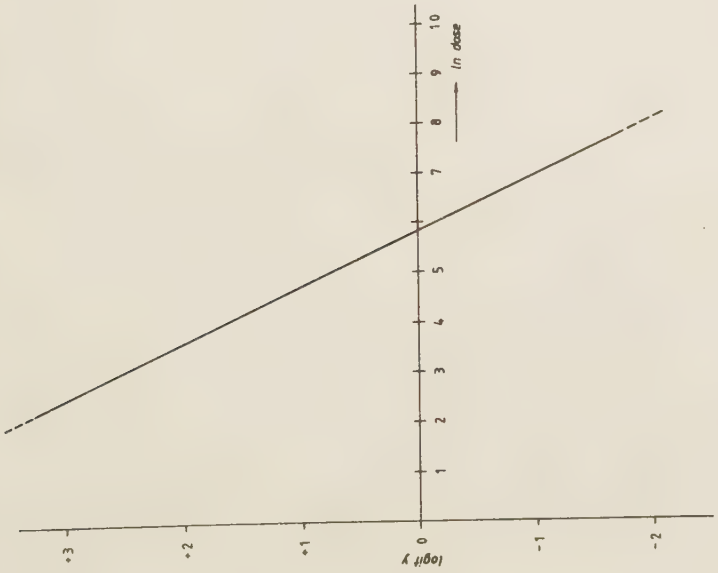
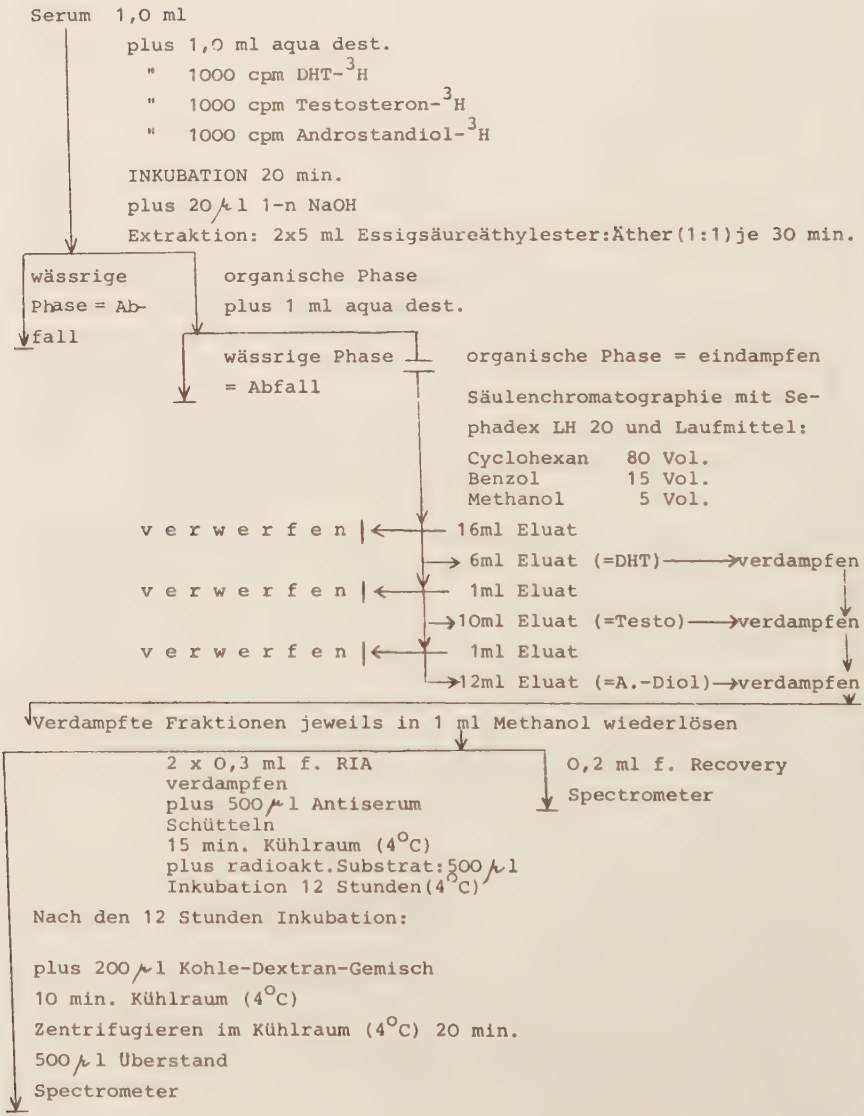


Abb. 3:

Abb. 4: Zusammenfassendes Schema der Steroidhormongewinnung aus dem Rattenserum



IV. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Veränderungen des Serumtestosteronspiegels und der Hodengewichte werden in den Tabellen I - VI und in den Abbildungen 5 - 10 gezeigt.

Bemerkung zur Statistik: Die relativ kleinen Kollektive von jeweils vier Serumwerten pro Untergruppe schränkten den statistischen Aussagewert ein; als Test mußte das parameterfreie, zweiseitige Verfahren nach Wilcoxon, Mann und Whitney angewendet werden.

Abkürzungen in den folgenden Kapiteln:

HCG 10 für 10 I.U. HCG/100 g Körpergewicht
HCG 20 für 20 I.U. HCG/100 g Körpergewicht
HCG 40 für 40 I.U. HCG/100 g Körpergewicht
ng für ng/100 ml Serum

IV.1. Serumtestosteron (s. Tab. I, II und Abb. 5, 6, 7, 8)

IV.1.1. Testosteronwerte der Kontrolltiere

Die geschlechtlichen Entwicklungsperioden werden bei der Ratte folgenden Altersstufen zugeordnet:

Präpubertäre Periode = 26 Tage alt;
Pubertäre Periode = 35, 45, 56 Tage alt;
Erwachsene Periode = 65, 76 Tage alt.

Eine Zunahme von Testosteron bei den nur mit physiol.NaCl behandelten Tieren wurde vor allem bei den erwachsenen und spätpubertären Tieren gefunden. So ergaben sich 495 ng für die 56 tägigen, 577 ng für die 65- und 297 ng für die 76 tägigen Tiere. Für die präpubertären und pubertären Tiere wurden wesentlich niedrigere Werte gemessen, so 29 ng für die 26-, 40 ng für die 35-, und 79 ng für die 45 Tage alten Ratten. Statistisch signifikant ($\alpha = 0{,}05$) unterschieden sich die 45- von den 56 Tage alten Ratten.

IV.1.2. Testosteronwerte nach steigender HCG-Stimulation ohne PMS-Vorbehandlung

IV.1.2.1. Altersabhängigkeit

Nach der Verabreichung von HCG 10 war die Zunahme von Testosteron während der präpubertären und pubertären Periode geringer, als während der erwachsenen Periode. Die stärkste sichtbare Zunahme war mit 6108 ng bei den 65- und mit 4966 ng bei den 76 tägigen Ratten zu verzeichnen; während bei den 26 Tägigen Werte um 300 ng gemessen wurden und die pubertären Tiere mit zunehmendem Alter auch zunehmende Werte von ca. 1300 ng bis ca. 3200 ng boten. Statistisch signifikant (α = 0,05) unterschieden sich hier die 26- von den 35 Tägigen und die 35- von den 45 Tägigen.

Prozentual gesehen bot sich jedoch ein ganz anderes Bild: Hier ergab sich, von der jüngsten Gruppe mit 920 % Zunahme ausgehend, ein rapider Anstieg auf 3213 % bei den 35-, bzw. sogar 3269 % bei den 45 tägigen Ratten. Innerhalb der pubertären Periode war jedoch wiederum ein eklatantes Abfallen auf 539 % bei den 56 Tägigen zu beobachten, um dann von diesem Tiefpunkt aus wieder auf 957 % bei den 65-, bzw. auf 1569 % bei den 75 Tage alten Tieren mäßig anzusteigen. Ein statistisch signifikanter (α = 0,05), prozentualer Anstieg bzw. Abfall ergab sich sowohl zwischen den 26- und 35 Tägigen, als auch zwischen den 45- und 56 Tage alten Tieren.

Der Verlauf der absoluten und prozentualen Werte zeigte nach der Injektion von HCG 20 ein ganz ähnliches Bild:

Auch hier waren die höchsten absoluten Werte bei der Erwachsenengruppe zu erkennen. Wiederum war das Maximum mit 7518 ng bei den 65 Tägigen zu finden, während die 76 Tage alten Tiere mit 7276 ng etwas niedrigere Werte zeigten. Deutlich niedriger waren die Werte wieder bei der präpubertären und pubertären Gruppe. Aber auch innerhalb dieser beiden Gruppen zeigte sich mit zunehmendem Alter ein stetes Zunehmen der Testosteronwerte im Serum. Die Werte lagen bei den jüngsten Ratten um 280 ng und nahmen dann innerhalb der pubertären Altersgruppen von ca. 1400 ng bis ca. 3600 ng. zu. Statistische Signifikanzen (α = 0,05) ergaben sich hier zwischen den 26- und 35 Tägigen, den 35- und 45 Tage alten, und den 56- und 65 Tage alten Tieren.

Bei der Verlaufskurve des "Prozentual-Anstiegs" war der höchste wiederum bei den pubertären Ratten zu verzeichnen. Beginnend bei den präpubertären 26-tägigen Tieren mit 855 % Zunahme kam es erneut zu einem rapiden Anstieg auf 3354 % bei den 35-Tägigen und zu einem Scheitelpunkt mit 3571 % bei den 45 Tage alten Ratten. Weiterhin war auch hier der abrupte Abfall innerhalb der pubertären Periode, nämlich auf 623 % bei den 56 Tage alten , zu beobachten. Von hier stiegen die Werte dann wiederum - parallel der Prozentverlaufskurve bei HCG 10-Stimulation - auf 1201 % bzw. auf 2345 % bei den 65- bzw. den 76 tägigen erwachsenen Ratten. Eine statistisch signifikante (α = 0,05) prozentuelle Testosteronzunahme ergab sich hier zwischen den 26- und 35 Tage alten Tieren, während wiederum ein signifikanter Abfall zwischen den 45- und 56 Tägigen zu verzeichnen war. Weitere signifikante Anstiege (gleiches Signifikanzniveau) ergaben sich zwischen den 56- und 65 Tägigen und den 65- und 76 Tage alten.

Unter der Behandlung der Tiere mit HCG 40 ergaben sich ebenfalls Werte, die denen bei geringerer HCG-Dosierung, bzgl. des altersabhängigen Verlaufes, ähnelten. So waren auch hier die höchsten absoluten Werte bei den erwachsenen Ratten zu verzeichnen, nämlich mit 10117 ng bei den 65- und etwas niedriger mit 7808 ng bei den 76 Tage alten Ratten. Für die 26 Tägigen wurden Werte um 250 ng gemessen, während in der pubertären Periode wiederum mit steigendem Alter weitersteigende Werte festgestellt wurden, und zwar um 1500 ng für die 35-, um 4300 ng für die 45- und ca. 5200 ng für die 56 Tägigen. Signifikanzen (α = 0,05) ergaben sich hier wiederum zwischen den 26- und 35-, den 35- und 45-, und den 56- und 65 Tage alten Ratten.

Bei der Betrachtung der Prozent-Verlaufskurve ergab sich ebenso das gewohnte Bild: Stärkster Anstieg und Scheitelpunkt in der Gruppe der 45 Tägigen mit 5352%; ebenso der starke Anstieg zwischen den Altersstufen 26 Tage und 35 Tage, erstere noch mit Werten um 755 %, letztere bereits mit Werten um 3596 %. Nach dem Scheitelpunkt der 45 Tägigen wiederum ein starker Abfall auf 939 %, noch innerhalb der Pubertätsgruppe, für die 56 Tägigen, und schließlich das Ansteigen der Werte auf 1651 % bzw. auf 2524 % bei den erwachsenen Tieren im Alter von 65- bzw. 76 Tagen. Eine statistisch signi-

fikante (α = 0,05) prozentuale Testosteronzunahme ergab sich zwischen den 26- und 35 Tage alten, während zwischen den 45- und 56 Tägigen wiederum ein signifikanter Abfall der Werte festzustellen war.

IV.1.2.2. Dosisabhängigkeit

Auch hier wurde, mit Ausnahme der jüngsten Gruppe, die Tendenz sichtbar, daß mit höherer HCG-Dosierung auch höhere Testosteronwerte im Serum bestimmt werden konnten. Dieser Trend war also bei den 26-Tägigen nicht vorhanden; hier ergaben sich vielmehr Werte in genau umgekehrter Reihenfolge: Für die höchste HCG-Dosierung ergab sich, für diese Betrachtung, der niederste Wert mit 248 ng; für HCG 20 ein etwas höherer Wert von 277 ng und schließlich 296 ng für HCG 10. Bei den 35 Tage alten Ratten nun die erwähnten ansteigenden Testosteronwerte mit zunehmender HCG-Stimulation, von 1339 ng auf 1396 ng auf 1494 ng.

Ein ähnliches Verlaufsbild nun auch für alle weiteren Altersgruppen: So steigen die gemessenen Werte für die 45 Tägigen von 2677 ng über 2917 ng auf 4331 ng an.

Bei den 56 Tage alten steigerten sich die Werte, bei gleicher Reihenfolge der Betrachtung, von 3170 ng über 3587 ng auf 5155 ng.

Schließlich noch in der Erwachsenengruppe der 65- bzw. 76 tägigen Ratten ergab sich für die Ersteren der ansteigende Trend von 6108 ng über 7518 ng auf 10117 ng, für die Letzteren von 4966 ng über 7276 ng auf 7808 ng.

Statistisch signifikant (α = 0,05) unterschieden sich, für alle Altersgruppen zutreffend, die Kontrollwerte von den HCG-Werten in jeder Dosierung.

Verglich man die HCG 10-Werte mit den HCG 20-Werten, so ergab sich lediglich für die älteste Gruppe (76 Tage) ein signifikanter Unterschied (α = 0,05).

Bei der statistischen Untersuchung der HCG-10-Werte im Vergleich zu den HCG-40-Werten, ergab sich für keine Altersstufe eine Signifikanz für α = 0,05.

Das gleiche Ergebnis erhielt man auch beim Vergleich der HCG-20-Werte mit den HCG-40-Werten.

Der Prozentualkurvenverlauf ergab bei dieser Betrachtung der Dosisabhängigkeit keine neuen Aspekte, sondern nur das identische Bild, nämlich, mit Ausnahme der jüngsten Gruppe (26 Tage), mit höherer HCG-Dosierung ansteigende Tendenz der Testosteronwerte im Serum.

IV.1.3. Testosteronwerte nach steigender HCG-Stimulation mit gleichbleibender PMS-Vorbehandlung

IV.1.3.1. Altersabhängigkeit

Die absoluten Serumtestosteronwerte nahmen bei den mit PMS (2x10 I.U./100 g Körpergewicht) vorbehandelten Tieren, denen anschließend noch zusätzlich HCG 10 verabreicht wurde, altersabhängig zu. Auffallend war hier, aber ebenso bei den Tieren die PMS + höhere HCG-Dosen erhielten, der enorme Sprung von 663 ng bei den 45 Tägigen auf 17904 ng bei der nächsten Altersstufe, den 56 Tage alten Ratten. Also ein steiler Anstieg um das 27-fache innerhalb der pubertären Gruppe. Die beiden jüngsten Gruppen (26 und 35 Tage) lagen mit 217 ng bzw. 361 ng noch unter den Werten, die für die 45 Tägigen gemessen wurden. Bei den erwachsenen Tieren stiegen die Werte noch über die der 56 Tägigen hinaus, nämlich auf 19298 ng bei den 65 Tage alten Ratten und 32519 ng als Maximum bei den 76 Tage alten.

Ein statistisch signifikanter Unterschied (α = 0,10) konnte zwischen den 26- und 35 Tägigen und den 45- und 56 Tage alten Ratten festgestellt werden.

Die Verlaufskurve der prozentuellen Testosteronzunahme sah wiederum etwas anders aus. Hier ergab sich ein relativ leichter Anstieg zwischen den beiden jüngsten Gruppen, von 649 % (26 Tage) auf 793 % (35 Tage), dann ein geringer Abfall auf 735 % für die 45 Tägigen, dann jedoch ein enormer Sprung auf 3511 % bei den 56 Tage alten Tieren. In der Erwachsenengruppe zeichnete sich dann zunächst ein relativ geringer Abfall der Werte auf 3240 % für die 65 Tägigen ab, um schließlich ein Maximum an prozentuellem Testosteronzuwachs im Serum, nach PMS-HCG 10-Behandlung, mit 10829 % bei der ältesten Gruppe (76 Tage) zu erreichen.

Einen statistisch signifikanten Anstieg (α = 0,05) sah man zwischen den Altersstufen 45- und 56 Tage; während der Anstieg zwischen den 65- und 76 Tage alten Tieren für α = 0,05 signifikant war.

Bei PMS + HCG 20 sah die altersabhängige Verlaufskurve der absolute Serumtestosteronwerte ganz ähnlich aus: Mit zunehmendem Alter zunehmende Werte, wobei der schon vorher beschriebene, auffallende Sprung, in der Zunahme der Werte, wiederum zwischen den 45- und 56 Tage alten Tieren zu beobachten war. Die Werte stiegen innerhalb der drei jüngsten Gruppen von 116 ng (26 Tage) über 481 ng (35 Tage) auf 693 ng (45 Tage); bei der nächsten Altersgruppe (56 Tage) war dann der erwähnte, plötzliche Sprung auf 9085 ng zu verzeichnen. Die Maximalwerte wurden erneut in den ältesten Gruppen mit 18436 ng (65 Tage) und 18440 (76 Tage) erreicht.

Die statistische Betrachtung bot Signifikanzen zwischen den 26- und 35 Tage alten, den 45- und 56 Tage alten und zwischen den 56- und 65 Tage alten Ratten.

Die Verlaufskurve der prozentuellen Testosteronzunahme sah hier geringgradig anders aus, als die für PMS + HCG 10 beschriebene. Die Werte stiegen von 301 % für die jüngste Gruppe (26 Tage), auf 1091 % bei den 35 Tägigen. Anschließend war eine abfallende Tendenz der Werte auf 773 % bei der nächst älteren Gruppe (45 Tage) zu erkennen und schließlich wieder ein steiles Ansteigen auf 1732 % bei den 56 Tage alten Tieren. Bei den 65- und 76 Tage alten waren diesmal die höchsten Werte mit 3091 % bzw. 6097 % zu verzeichnen. Signifikanzen ließen sich, für α = 0,05, zwischen den 45- und 56 Tägigen, als auch zwischen den 56- und 65 Tägigen ermitteln.

Schließlich noch die altersabhängige Verlaufskurven für die PMS + HCG 40 -- Tiere. Auch hier ergaben sich für den Verlauf der absoluten Werte keine wesentlich anderen Aspekte. So war wiederum innerhalb der drei jüngsten Gruppen ein steter Anstieg von 178 ng (26 Tage), über 557 ng (35 Tage) auf 704 ng (45 Tage) festzustellen. Dann wieder ein enormer Sprung auf 19886 ng bei den 56 Tägigen. Höchstwerte ergaben sich mit 20093 ng bzw. 60253 ng für die 65- bzw. 76 Tage alten Ratten.

Statistische Signifikanzen (α = 0,05) zeichneten sich zwischen den 26- und 35 Tage alten, und den 45- und 56 Tage alten Tieren ab.

Auch der Verlauf der Prozentualwerte ähnelte denen, die bereits an entsprechenden Stellen beschrieben wurden. Hier kam es innerhalb der jüngsten Altersgruppen, von 514 % ausgehend (26 Tage), zu einem Anstieg auf 1278 % (35 Tage). Für die 45 Tägigen wurde dann ein Abfall der Werte auf 786 % ermittelt; von hier aus dann eine starke Zunahme auf 3911 % für die Ältesten der pubertären Gruppe, die 56 Tägigen. Bei den erwachsenen Ratten zeigte sich zunächst wieder ein relativ geringerer Abfall der Werte auf 3378 % (65 Tage), um schließlich den Höchstwert von 20200 % bei den ältesten Tieren (76 Tage) zu erreichen.

Signifikanzen (α = 0,05) in der prozentuellen Testosteronzunahme zeigten sich zwischen den 26- und 35 Tage alten, den 45- und 56 Tage alten und den 65- und 76 Tage alten Ratten.

IV.1.3.2. Dosisabhängigkeit

Hier konnte bei der Betrachtung der Absolutwerte keine solche, größtenteils durchschlagende Gesetzmäßigkeit festgestellt werden, wie dies bei den Werten ohne PMS-Vorbehandlung gelang, nämlich, daß sich mit höherer HCG-Dosis höhere Testosteronwerte im Serum ergaben.

Bei der jüngsten Gruppe (26 Tage) ergaben sich entsprechend der höheren HCG-Dosis bei gleichbleibender PMS-Vorbehandlung folgende Werte: Von 217 ng (PMS + HCG 10) ein Abfall der Testosteronkonzentration auf 116 ng (PMS + HCG 20) und schließlich ein Anstieg auf 178 ng (PMS + HCG 40).

In den pubertären Altersstufen von 35 und 45 Tagen wurden auch unter diesen Versuchsbedingungen mit jeweils höherer HCG-Stimulation höhere Testosteronwerte gemessen; so ergab sich im ersten Fall, von 361 ng (PMS + HCG 10) ein Anstieg über 481 ng (PMS + HCG 20) auf 557 ng (PMS + HCG 40); im zweiten Fall zeigte sich ebenso eine ansteigende Tendenz von 663 ng (PMS + HCG 10) auf 693 ng (PMS + HCG 20) auf 704 ng (PMS + HCG 40).

Für die ältesten pubertären Ratten (56 Tage) konnte jedoch hier diese ansteigende Tendenz der Werte nicht mehr festgestellt werden. Es resultierten in dieser Altersstufe Werte, die für PMS + HCG 20 mit 9085 ng niedriger lagen, als für PMS + HCG 10 mit 17904 ng. Der PMS + HCG 40 Wert dagegen lag mit 19886 ng höher als der PMS + HCG 10 Wert.

Ein ähnliches Verhalten der Serumkonzentrationen war auch für die erwachsenen, 65- und 76 Tage alten Ratten zu erkennen. Hier wurden für die 65 Tägigen nach PMS + HCG 10 19298 ng gemessen, während nach PMS + HCG 20 18436 ng und nach PMS + HCG 40 20093 ng resultierten. Bei den 76 Tägigen wurden insgesamt noch höhere Werte erzielt, so nach PMS + HCG 10 32519 ng, nach PMS + HCG 20 mit 18440 ng deutlich weniger und mit 60253 ng für PMS + HCG 40 den überhaupt höchsten Wert.

Statistisch gesehen unterschieden sich sämtliche PMS + HCG-Dosierungen signifikant (α = 0,05) von den jeweiligen Kontrollwerten, in allen Altersstufen.

Bei den 26 Tägigen lag der PMS + HCG 10-Wert signifikant höher (α = 0,05), als der PMS + HCG 20-Wert, der jedoch ebenso signifikant niedriger lag, als der PMS + HCG 40-Wert.

Für die 35 Tage alten Tiere ergab sich lediglich, daß der PMS + HCG 10-Wert signifikant (α = 0,05) kleiner ist, als der PMS + HCG 40 Wert. Innerhalb der 45 Tägigen konnte bei den mit PMS vorbehandelten Tieren keine Signifikanz ermittelt werden.

Wurde die Altersstufe '56 Tage' statistisch betrachtet, so ergab sich, daß der PMS + HCG 40-Wert signifikant (α = 0,05) höher lag, als der PMS + HCG 20-Wert.

Die Altersstufe der 65 Tägigen zeigte für α = 0,05 keine Signifikanz. Bei der ältesten Gruppe (76 Tage) ergab sich, daß der PMS + HCG 40-Wert signifikant (α = 0,05) höher liegt, als der PMS + HCG 20-Wert.

Für diese Betrachtung der Dosisabhängigkeit ergab die Verlaufskurve prozentuelle Testosteronzunahme keine zusätzlichen Aspekte, und wurde deshalb nur in der Abbildung 8 berücksichtigt.

IV.1.4. Vergleich der Testosteronwerte bei gleicher HCG-Stimulation mit und ohne PMS-Vorbehandlung

Bei dieser Vergleichsanordnung schien es, daß eine Gesetzmäßigkeit insofern auftrat, daß die PMS-vorbehandelten Tiere in den drei jüngeren Gruppen, ganz gleich bei welcher zusätzlichen HCG-Stimulation, immer (zum Teil erheblich) niedrigere Serumtestosteronwerte zeigten, als die Tiere in den gleichen Altersgruppen, die nur mit der entsprechenden HCG-Dosis behandelt wurden. Innerhalb der drei älteren Gruppen verhielt es sich dagegen genau umgekehrt; hier zeigte sich, daß die PMS-vorbehandelten Tiere, unabhängig von der zusätzlichen HCG-Dosis, immer eine stärkere Zunahme des Serumtestosterons ergaben, als diejenigen Tiere, denen nur die jeweilige entsprechende HCG-Dosis injiziert wurde.

Die genauere Betrachtung der Werte nach HCG 10 gegenüber denen, nach PMS + HCG 10, ergab folgende Sachverhalte:

Für die 26 Tägigen wurden nach alleiniger HCG-Stimulation 296 ng gemessen. Nach zusätzlicher PMS-Vorbehandlung resultierten in dieser Altersgruppe hingegen nur noch 217 ng.

Der Unterschied in der Testosteronkonzentration nahm bei der nächstälteren Gruppe (35 Tage) noch wesentlich deutlicher zu, so ergaben sich 1339 ng für HCG allein und nur 361 ng nach zusätzlicher PMS-Vorbehandlung. Eine weitere Zunahme des Unterschiedes in der Testosteronkonzentration war auch bei den 45 Tägigen nachzuweisen. Hier ergaben sich 2677 ng für die alleinige HCG-10 Behandlung, während nach zusätzlicher PMS-Vorbehandlung nur 663 ng gemessen wurden.

Bei den 56 Tage alten Ratten war, ebenso wie bei den erwachsenen Altersgruppen, eine schlagartige Umkehr der Verhältnisse zu beobachten. Zwar nahm der Unterschied in der Testosteronkonzentration weiterhin zu, doch zeigte sich dieses Mal der weitaus höhere Wert mit 17904 ng für die PMS + HCG 10-behandelten Tiere, während die nur mit HCG 10-behandelten Tiere 3170 ng ergaben.

Dieser deutliche Unterschied der Werte wurde bei den 65 und 76 Tage alten Ratten, in der gleichen Weise, nahezu beibehalten bzw. sogar noch vergrößert. So ergaben sich für die Ersteren 6108 ng nach alleiniger HCG-Stimulation und 19298 ng nach zusätzlicher PMS-

Vorbehandlung; für die Letzteren wurden 4966 ng nach HCG 10 und 32519 ng nach PMS + HCG 10 gemessen.

Bei der statistischen Betrachtung dieses Sachverhaltes ergaben sich Signifikanzen (α = 0,05) im Unterschied der Testosteronkonzentrationen für die 35-, die 45-, die 56-, die 65-, und die 76 Tägigen.

Beim Vergleich HCG 20 zu PMS + HCG 20, innerhalb aller Altersstufen, ergab sich ein ziemlich ähnlicher Sachverhalt, wie beim Vergleich von HCG 10 zu PMS + HCG 10.

Die 26 Tägigen Ratten zeigten mit 277 ng (für HCG 20) wiederum eine höhere Testosteronkonzentration, als die Tiere, die zusätzlich mit PMS vorbehandelt wurden; und für die 116 ng gemessen wurden.

Bei den 35- und 45 Tage alten waren erneut deutliche Zunahmen der Konzentrationsunterschiede zu erkennen. Für erstere waren 1396 ng für alleinige HCG 20-Behandlung gegenüber 418 ng nach zusätzlicher PMS-Vorbehandlung zu verzeichnen; für letztere 2917 ng (HCG 20) gegenüber 693 ng (PMS + HCG 20).

Für die 56 Tägigen trat nun wieder die bereits vorher erwähnte umgekehrte Situation ein. Hier wurden 3587 ng nach HCG 20 und 9085 ng nach PMS + HCG 20 gemessen.

Die gleiche Situation auch für die 65- und 76 tägigen Ratten. Im ersten Fall 7518 ng (HCG 20) gegenüber 18436 ng (PMS + HCG 20). Im zweiten Fall 7276 ng (HCG 20) gegenüber 18440 ng (PMS + HCG 20).

Signifikante (α = 0,05) Testosteronunterschiede konnten bei den 26-, 35-, 45-, 56- und 65 Tägigen nachgewiesen werden.

Schließlich noch derselbe Vergleich der Testosteronkonzentrationen nach HCG 40 und PMS + HCG 40.

Bei den 26-, 35- und 45 tägigen Ratten ergaben sich folgende Werte ohne PMS-, im Vergleich mit zusätzlicher PMS-Vorbehandlung:

Für die erste Gruppe 248 ng gegenüber 178 ng; für die zweite Gruppe 1494 ng gegenüber 557 ng; für die dritte Gruppe 4331 ng gegenüber 704 ng. Also insgesamt wieder die ähnliche Situation wie in den Gruppen mit niedrigeren HCG-Dosen.

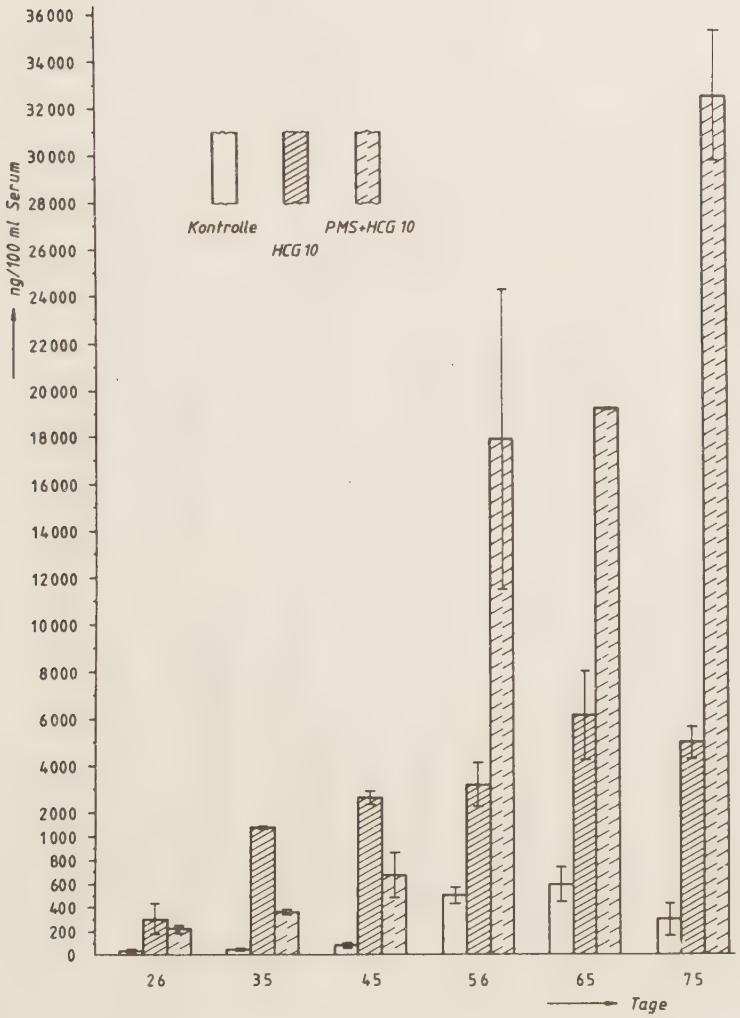


Abb. 5a: Altersabhängigkeit der Testosteron-Werte i.S. nach Applikation von 10 I.U. HCG pro 100 g Körpergewicht mit und ohne PMS-Vorbehandlung

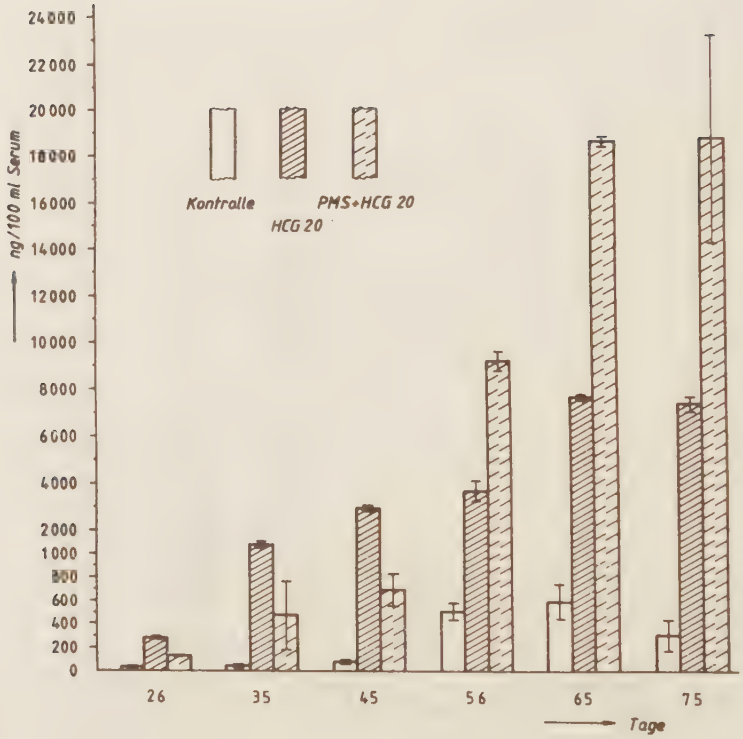


Abb. 5b: Altersabhängigkeit der Testosteron-Werte i.S. nach Applikation von 20 I.U. HCG pro 100 g Körpergewicht mit und ohne PMS-Vorbehandlung

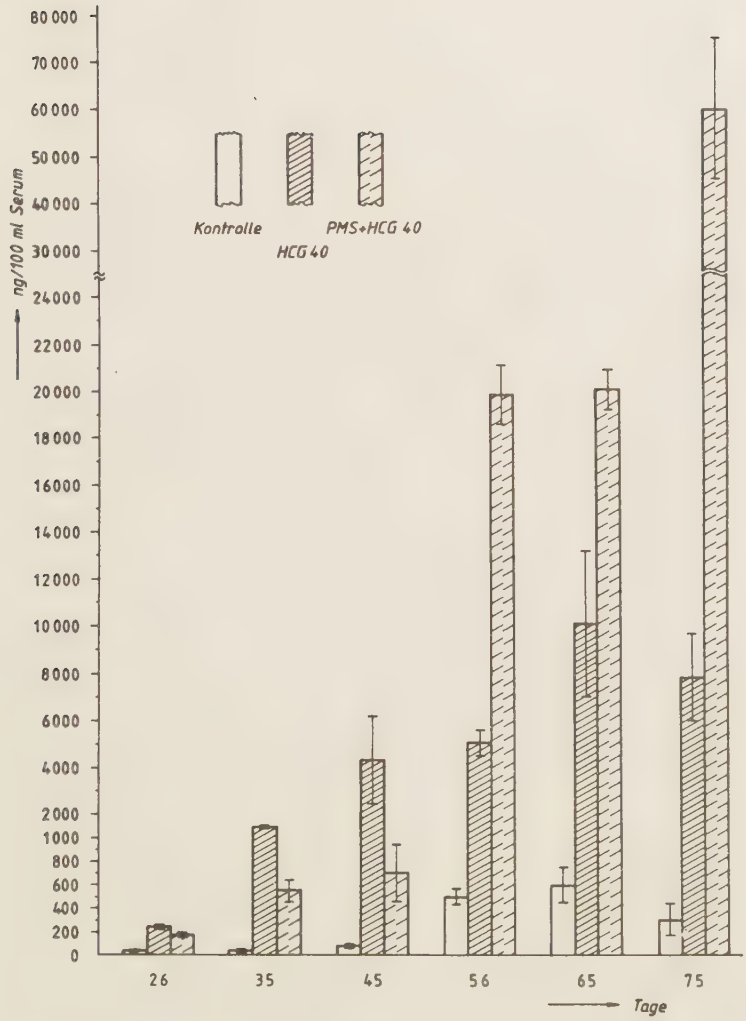


Abb. 5c: Altersabhängigkeit der Testosteron-Werte i.S. nach Applikation von 40 I.U. HCG pro 100 g Körpergewicht mit und ohne PMS-Vorbehandlung

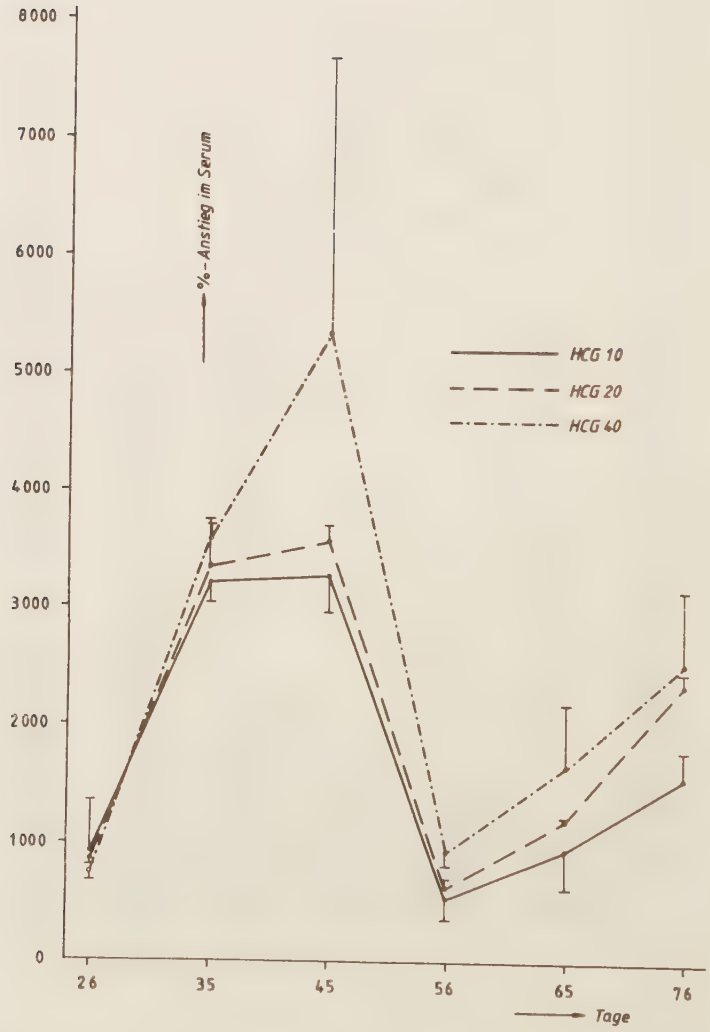


Abb. 6a: Altersabhängigkeit der Testosteron-Werte i.S. bei unterschiedlichen HCG-Stimulationen (Prozentverlaufskurve)

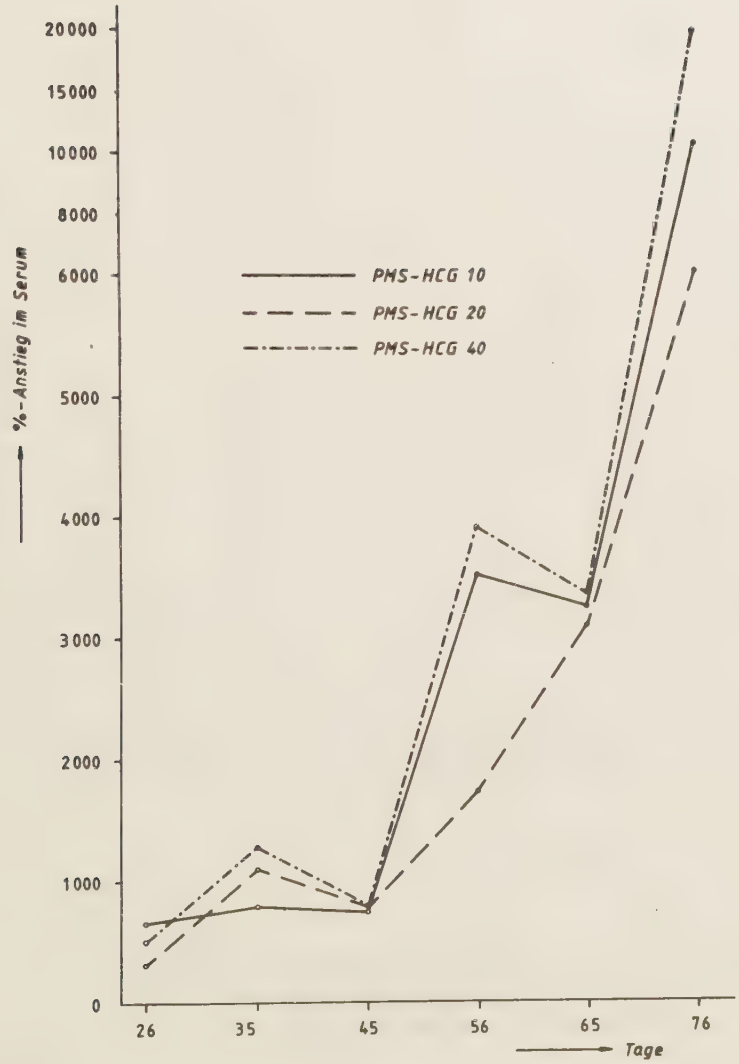


Abb. 6b: Altersabhängigkeit der Testosteron-Werte i.S. bei unterschiedlichen HCG-Stimulationen sowie gleichbleibender PMS-Vorbehandlung. (Prozentverlaufskurve)

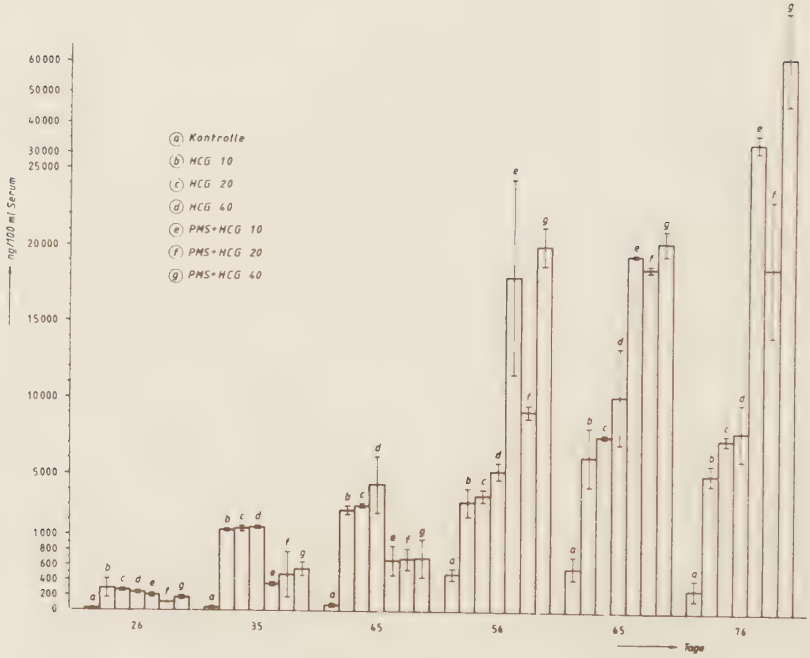


Abb. 7: Die Dosisabhängigkeit der Testosteron-Werte i.S. bei unterschiedlicher HCG-Stimulation mit und ohne PMS-Vorbehandlung

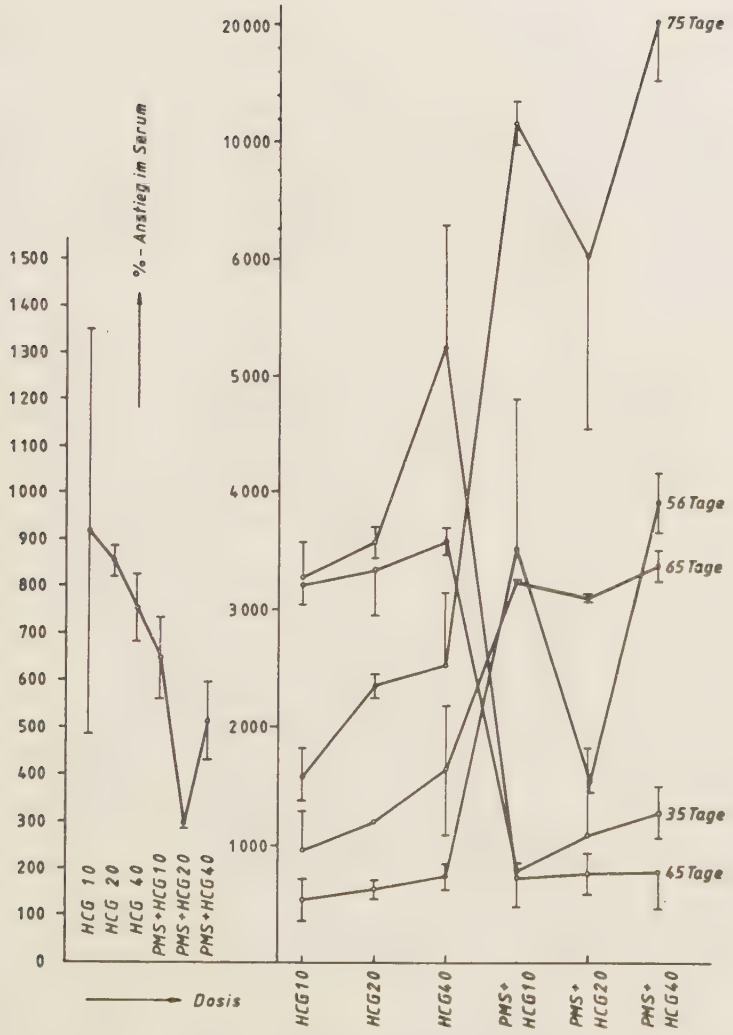


Abb. 8: Dosisabhängigkeit der Testosteron-Werte i.S. bei unterschiedlicher HCG-Stimulation mit und ohne PMS-Vorbehandlung (Prozentualverlaufskurve). Der linke Abbildungsteil zeigt Prozentualverlaufskurve für die Gruppe der 26 tägigen Ratten.

Tabelle I : Testosteron-Serumkonzentrationen in ng/100ml $\pm s_{\bar{x}}$

Alter in Tagen	Kontrolle	HCG 10	HCG 20	HCG 40
26	29,04 $\pm$ 5,64	296,23 $\pm$ 125,55	277,38 $\pm$ 10,74	248,40 $\pm$ 21,46
+ PMS		217,67 $\pm$ 24,98	116,56 $\pm$ 2,83	178,41 $\pm$ 24,16
35	40,43 $\pm$ 17,02	1339,74 $\pm$ 69,24	1396,49 $\pm$ 163,30	1494,48 $\pm$ 46,82
+ PMS		361,25 $\pm$ 24,50	481,7 $\pm$ 295,16	557,32 $\pm$ 88,15
45	79,45 $\pm$ 20,71	2677,32 $\pm$ 247,86	2917,23 $\pm$ 107,84	4331,72 $\pm$ 1854,94
+ PMS		663,84 $\pm$ 198,45	693,71 $\pm$ 141,47	704,70 $\pm$ 253,60
56	495,71 $\pm$ 71,19	3170,69 $\pm$ 910,32	3587,14 $\pm$ 410,42	5155,26 $\pm$ 553,55
+ PMS		17904,36 $\pm$ 6365,67	9085,4 $\pm$ 411,0	19886,26 $\pm$ 1285,61
65	577,7 $\pm$ 149,2	6108,45 $\pm$ 1934,5	7518,83 $\pm$ 97,54	10117,38 $\pm$ 3114,21
+ PMS		19298,42 $\pm$ 38,8	18436,9 $\pm$ 193,43	20093,04 $\pm$ 821,24
76	297,54 $\pm$ 132,42	4966,46 $\pm$ 662,27	7276,95 $\pm$ 303,32	7808,03 $\pm$ 1856,87
+ PMS		32519,41 $\pm$ 2785,62	18440,2 $\pm$ 4418,77	60253,17 $\pm$ 15008,42

Tabelle II : Testosteron-Serumkonzentrationsanstieg in %, Mittelwerte $\pm s_{\bar{x}}$

Alter in Tagen	HCG 10	HCG 20	HCG 40
26	920,06±432,35	855,16±36,96	755,38±73,90
+ PMS	649,54±86,03	301,39±8,20	514,75±82,97
35	3213,73±171,27	3354,10±403,90	3596,47±115,80
+ PMS	793,51±60,61	1091,45±730,05	1278,49±218,04
45	3269,82±311,98	3571,78±135,73	5352,13±2334,73
+ PMS	735,54±249,78	773,14±178,06	786,97±319,20
56	539,72±183,73	623,64±82,79	939,98±111,66
+ PMS	3511,92±1284,09	1732,81±82,92	3911,67±259,35
65	957,37±334,86	1201,52±16,88	1651,32±539,07
+ PMS	3240,56±7,62	3091,44±33,49	3378,11±142,16
76	1569,18±222,58	2345,71±101,95	2524,20±624,08
+ PMS	10829,42±936,22	6097,55±1485,10	20200,44±5094,17

Ebenso wiederum die gleiche Tendenz wie in den entsprechenden, vorhergehenden Vergleichen für die 56-, 65- und 76 tägigen Ratten: 5155 ng (nach HCG 40) gegenüber 19886 ng (nach PMS + HCG 40) für die 56 Tägigen, 10117 ng (nach HCG 40) gegenüber 20093 ng (PMS + HCG 40) für die 65 Tägigen, und 7808 ng (nach HCG 40) gegenüber 60253 ng (PMS + HCG 40) für die 76 Tägigen.

Statistisch signifikante (α = 0,05) Unterschiede im Testosteronspiegel zeigten sich in den Altersstufen 35, 45, 56, 65 und 76 Tage.

IV.1.5. Die Veränderung des Bruches $\frac{\text{DHT + A.Diol}}{\text{Testosteron}} \times 100$ in den heranreifenden Tieren unter dem Einfluß unterschiedlicher HCG-Stimulation mit und ohne PMS-Vorbehandlung (s. Tab. III und Abb. 9)

Das Profil des Bruches zeigte grundsätzlich bei jeder Altersstufe und bei jeder HCG-Stimulation mit und ohne PMS-Vorbehandlung, daß der Bruch in den unreiferen Gruppen, d.h. bei den 26-, 35- und 45 Tage alten Ratten, signifikant (α = 0,10) größer war, als bei den reiferen bzw. reifen Altersgruppen. Bei den allein mit HCG stimulierten Tieren fiel dieser Unterschied etwas weniger deutlich als bei den zusätzlich mit PMS vorbehandelten Tieren aus.

Auch bei den Kontrolltieren konnte die gleiche Tendenz dieses Bruches aufgezeigt werden; so ergab sich auch hier für die drei jüngeren Gruppen ein deutlich größerer Bruch als bei den restlichen Altersstufen; Signifikanz für α = 0,10 auch hier.

Verglich man nun die Brüche bei alleiniger HCG-Stimulation mit denen, bei zusätzlicher PMS-Vorbehandlung, so zeigte sich, daß erstere, besonders bei den drei jüngeren Gruppen, wesentlich deutlicher unterhalb der Brüche der Kontrollgruppen lagen, als letztere. Im Bereich der 56-, 65- und 76 tägigen Ratten glichen sich die Brüche bei PMS-vorbehandelten oder nicht vorbehandelten Tieren mehr oder weniger aneinander an; die Brüche der PMS-Vorbehandelten waren für diesen Altersbereich fast immer noch kleiner, als bei denjenigen reiferen Tieren, die nur mit HCG stimuliert wurden. Insgesamt

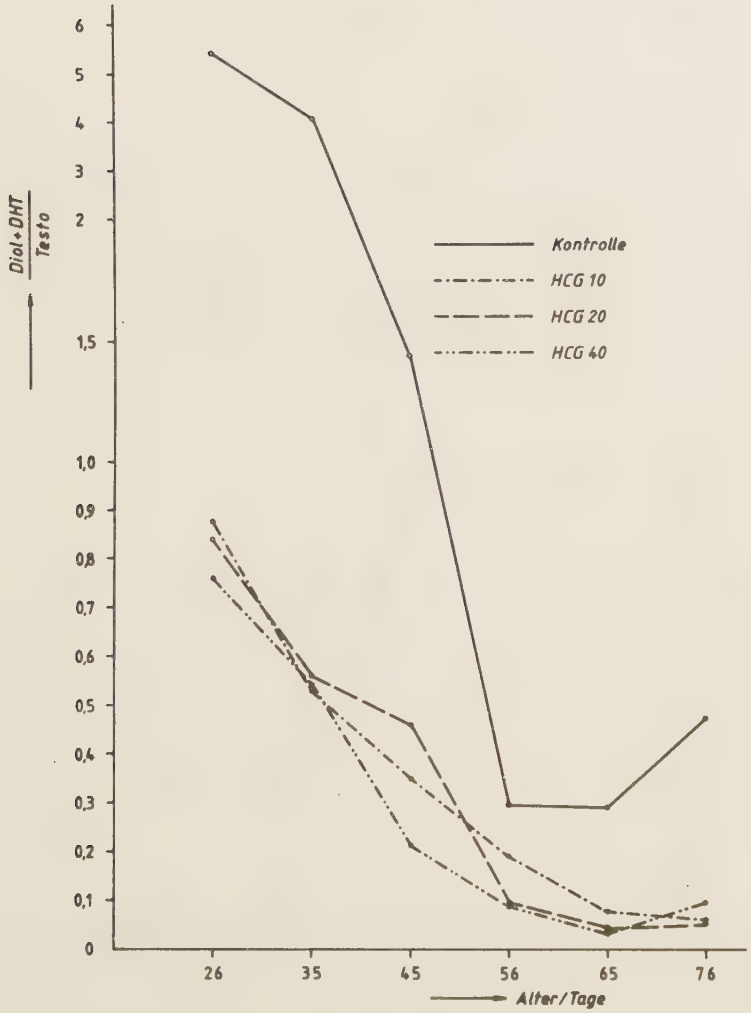


Abb. 9a: Die Veränderung des Bruches $\frac{\text{DHT + A.-Diol}}{\text{Testo}}$ in den heranreifenden Tieren unter dem Einfluß unterschiedlicher HCG-Stimulationen.

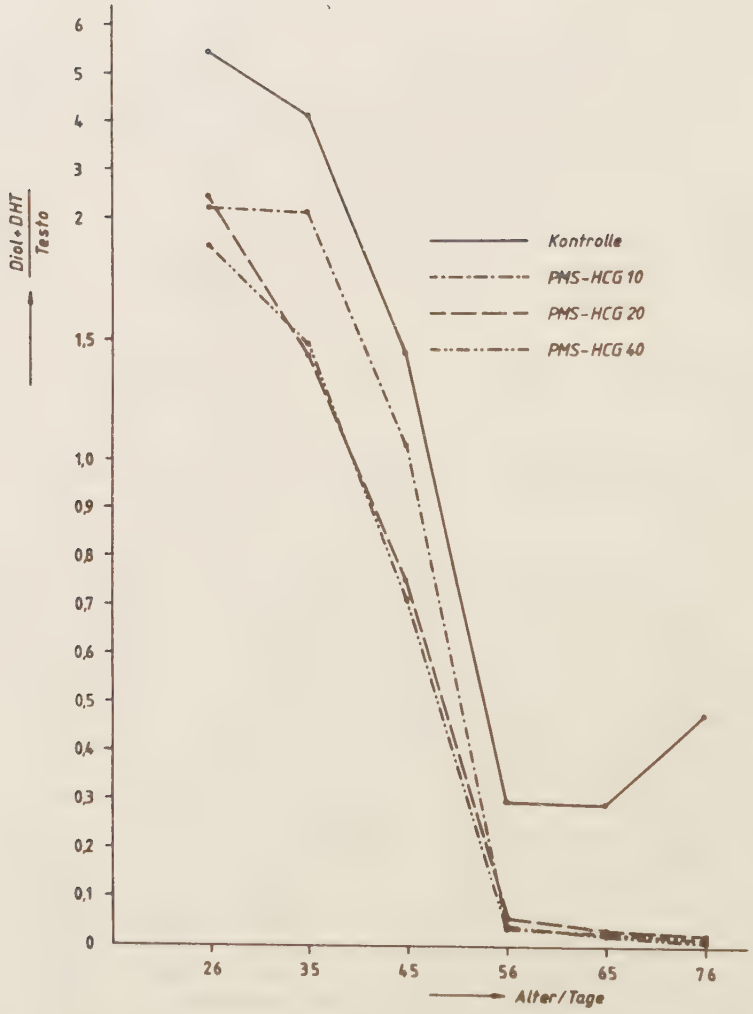


Abb. 9b: Die Veränderung des Bruches $\frac{\text{DHT + A.-Diol}}{\text{Testo}}$ in den heranreifenden Tieren unter dem Einfluß unterschiedlicher HCG-Stimulation mit gleichbleibender PMS-Vorbehandlung.

Tabelle III : Werte des Quotienten $\frac{\text{Diol + DHT}}{\text{Testosteron}} \times 100$

Alter in Tagen	26	35	45	56	65	76
Kontrolle	546	414	143	29,8	29,3	46,6
HCG 10	88	53	35	19	7,9	6,0
HCG 20	84	56	46	9,8	4,4	5,3
HCG 40	76	54	21	8,8	3,1	9,5
PMS+HCG 10	225	210	106	3,6	2,6	1,6
PMS+HCG 20	247	143	75	5,7	3,4	2,4
PMS+HCG 40	189	148	72	3,7	2,5	1,1

Statistisch signifikante Unterschiede ($\alpha = 0,05$) ergaben sich hierbei für HCG 10 zwischen den 26- und 35 Tägigen und ($\alpha = 0,10$) zwischen den 35- und 45 Tage alten Ratten.

Für HCG 20 war eine Signifikanz ($\alpha = 0,05$) zwischen den 35- und 45 Tägigen zu verzeichnen.

Bei der HCG 40-Dosis unterschieden sich ebenfalls signifikant ($\alpha = 0,05$) die 35- von den 45 Tägigen.

Die Verlaufskurven der altersabhängigen prozentualen Hodengewichtsveränderungen der zusätzlich mit PMS vorbehandelten Tiere gleichen mit wenigen Abweichungen denen bei alleiniger HCG-Stimulation. Hier zeigte sich für PMS + HCG 10 und PMS + HCG 40 eine um ca. 7 % und ca. 5,5 % geringere Hodengewichtszunahme der 35 Tägigen gegenüber den 26 Tägigen; während für PMS + HCG 20 eine, wie auch vorhin beschriebene, Gewichtszunahme der Hoden (um ca. 14 %) zwischen diesen beiden Altersgruppen zu erkennen war. Für die 45-tägigen, pubertierenden Ratten war vergleichbar dazu, für alle drei Dosierungseinheiten, eine eklatant geringere Hodengewichtszunahme (bis zu ca. 32 % geringer) zu verzeichnen; die Gewichte für PMS + HCG 10 und PMS + HCG 20 fielen hier sogar um 2,63 % bzw. um 1,84 % unter die entsprechenden Kontrollwerte ab.

Für die 56 Tage alten, zeigte sich für alle drei Dosierungseinheiten wiederum eine starke Zunahme der in Prozenten ausgedrückten Hodengewichte gegenüber den 45 Tägigen und zwar um ca. 19 % bis ca. 45 %. Bei den 65 Tägigen war dagegen die Hodengewichtszunahme in etwa dem gleichen Umfang geringer (also um ca. 11-48 %), hier fiel sogar das Gewicht für PMS + HCG 10 um 5,66 % unter das entsprechende Kontrollgewicht. In der ältesten Gruppe (76 Tage) gab es lediglich für PMS + HCG 10 eine vergleichsweise geringe prozentuale Hodengewichtszunahme (um ca. 9 %) gegenüber den 65 Tägigen; während sich für die beiden anderen Dosierungseinheiten Abnahmen der Hodengewichte um 1,62 % (für PMS + HCG 20) und um 0,48 % (für PMS + HCG 40) unter die entsprechenden Kontrollgewichte und insgesamt ca. 4,5-8 % geringere Hodengewichte ergaben.

Signifikante Unterschiede ($\alpha = 0,05$) ergaben sich für PMS + HCG 10 zwischen den 35- und 45 Tägigen, zwischen den 45- und 56 Tägigen und zwischen den 56- und 65 Tägigen.

Bei PMS + HCG 20 unterschieden sich die 26- von den 35 Tage alten mit einer Signifikanz von $\alpha = 0,10$ und wiederum die 35- von den 45 Tägigen mit einer Signifikanz von $\alpha = 0,05$.

Für die Hodengewichte nach PMS + HCG 40 ergab sich lediglich ein signifikanter ($\alpha = 0,10$) Unterschied zwischen den 35- und 45 Tägigen.

IV.2.1.2. Dosisabhängigkeit

Die Frage der Dosisabhängigkeit der Hodengewichte (in %-KG) ergab sowohl für die nur mit HCG stimulierten, als auch für die zusätzlich mit PMS vorbehandelten Tiere keine eindeutigen Tendenzen bezüglich einer Gewichtszu- oder Gewichtsabnahme.

Zu statistisch signifikanten Werten ($\alpha = 0,05$) kam es hier vor allem in den beiden jüngsten Gruppen. So waren bei den 26 Tägigen sämtliche Werte für die mit PMS vorbehandelten Tiere signifikant höher als die Werte der Kontrolltiere. Ebenso lag auch der HCG 20-Wert signifikant über dem HCG 10-Wert.

Bei den 35 Tage alten Ratten waren außer den mit HCG 10 behandelten Tieren alle mit höheren HCG-Dosen stimulierten und mit PMS vorbehandelten Tiere in ihren Werten signifikant ($\alpha = 0,05$) höher als die entsprechenden Kontrolltiere.

IV.2.2. Vergleich der Hodengewichte bei gleicher HCG-Stimulation mit und ohne PMS-Vorbehandlung

Es war zu beobachten, daß es in doppelt so vielen Fällen zu einer Hodengewichtszunahme nach zusätzlicher PMS-Vorbehandlung als zu entsprechenden Abnahmen kam.

Bei der jüngsten Gruppe (26 Tage) kam es von 1,19 % KG für HCG 10 zu einer Zunahme auf 1,50 % KG für PMS + HCG 10 (das entspricht einer Zunahme um rund 26 %); für PMS + HCG 20 (1,40 % KG) zeigte sich gegenüber HCG 20 (1,33 % KG) ebenfalls eine Hodengewichtszunahme um ca. 5,5 % und auch der PMS + HCG 40-Wert lag mit 1,48 % KG deutlich über dem von HCG 40 mit 1,34 % KG (das entspricht einer

Zunahme von ca. 12 %).

In der Altersgruppe der 35 Tägigen kam es nur für HCG 10 (= 1,75 % KG) im Vergleich zu PMS + HCG 10 (1,77 % KG) und für HCG 20 (= 1,74 % KG) im Vergleich zu PMS + HCG 20 (1,95 % KG) zu einer Gewichtszunahme um ca. 2 % bzw. ca. 14 %; beim Vergleich von HCG 40 (= 1,81 % KG) und PMS + HCG 40 (1,76 % KG) ergab sich dagegen eine Abnahme um rund 3 %.

Bei den 45 Tage alten Ratten waren für die zusätzlich mit PMS behandelten Tiere geringgradige Hodengewichtsabnahmen im Vergleich zu den nur mit HCG stimulierten Tieren festzuhalten. So war der Wert von HCG 10 mit 1,86 % KG gering höher, als der von PMS + HCG 10 mit 1,85 % KG, ebenso der von HCG 20 mit 1,95 % KG etwas höher als der von PMS + HCG 20 mit 1,87 % KG und der Wert von HCG 40 mit 2,00 % KG etwas über dem von PMS + HCG 40 mit 1,97 % KG; die Hodengewichte lagen also für die PMS-vorbehandelten Tiere um rund 0,5 %, bzw. ca. 4,5 %, bzw. ca- 2 % unter denen, die nur mit HCG stimuliert wurden.

In der nächst älteren Gruppe (56 Tage) kam es für HCG 10 (1,91 % KG) im Vergleich zu PMS + HCG 10 (2,39 % KG) zu einer Zunahme der Hodengewichte um rund 28 %; für HCG 20 (2,09 % KG) war jedoch im Vergleich mit PMS + HCG 20 (1,97 % KG) wiederum eine Abnahme um ca. 7 % zu verzeichnen; bei HCG 40 (1,97 % KG) kam es dann wiederum für PMS + HCG 40 (2,11 % KG) zu einer Zunahme um ca. 5 %.

Für 65 Tägige lagen die Hodengewichte bei diesem Vergleich für PMS + HCG 10 (2,21 % KG) gegenüber HCG 10 (2,11 % KG) um rund 4 % höher; ebenso lag auch der Wert von PMS + HCG 20 (2,49 % KG) über dem von HCG 20 (2,30 % KG), was einem um ca. 8 % höheren Hodengewicht entsprach; auch der Wert von PMS + HCG 40 (2,44 % KG) lag über dem von HCG 40 (2,31 % KG), was einer Hodengewichtszunahme um rund 5 % gleichkam.

In der ältesten Gruppe (76 Tage) war für PMS + HCG 10 mit 2,73 % KG gegenüber HCG 10 mit 2,43 % KG eine Zunahme des Hodengewichtes um ca. 11,5 % zu verzeichnen; die gleiche Tendenz auch für PMS + HCG 20 (2,58 % KG) gegenüber HCG 20 (2,50 % KG), was einem um ca. 3 % schwereren Hoden bei den mit PMS vorbehandelten Tieren entsprach. Dagegen war für PMS + HCG 40 (2,61 % KG) gegenüber HCG 40 (2,79 %

KG) erneut eine Abnahme des Hodengewichtes um ca. 7 % festzustellen.

Die statistische Betrachtung dieses Vergleichs ergab signifikante (α = 0,05) Unterschiede der Hodengewichte bei den 26 Tägigen für HCG 10 gegenüber PMS + HCG 10, bei den 35 Tage alten für HCG 20 gegenüber PMS + HCG 20, und bei den 76 Tage alten Ratten für HCG 10 gegenüber PMS + HCG 10.

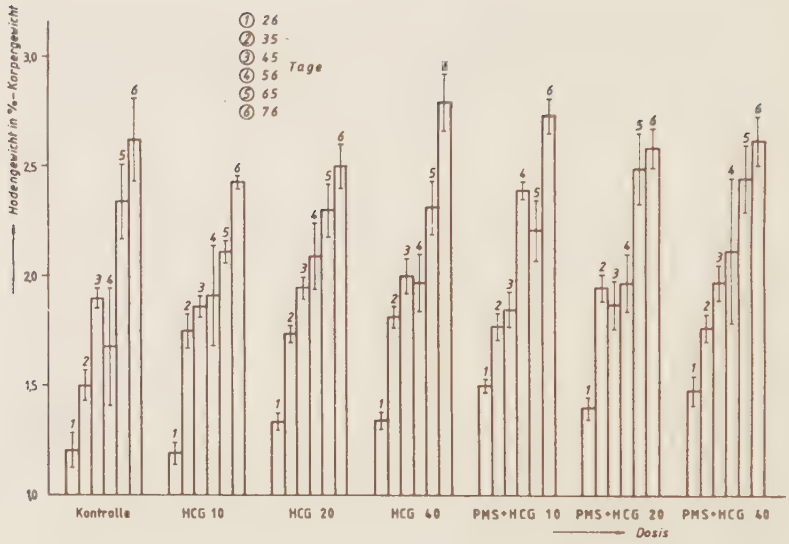


Abb. 10: Altersabhängigkeit des gonosomatischen Index (GSI)

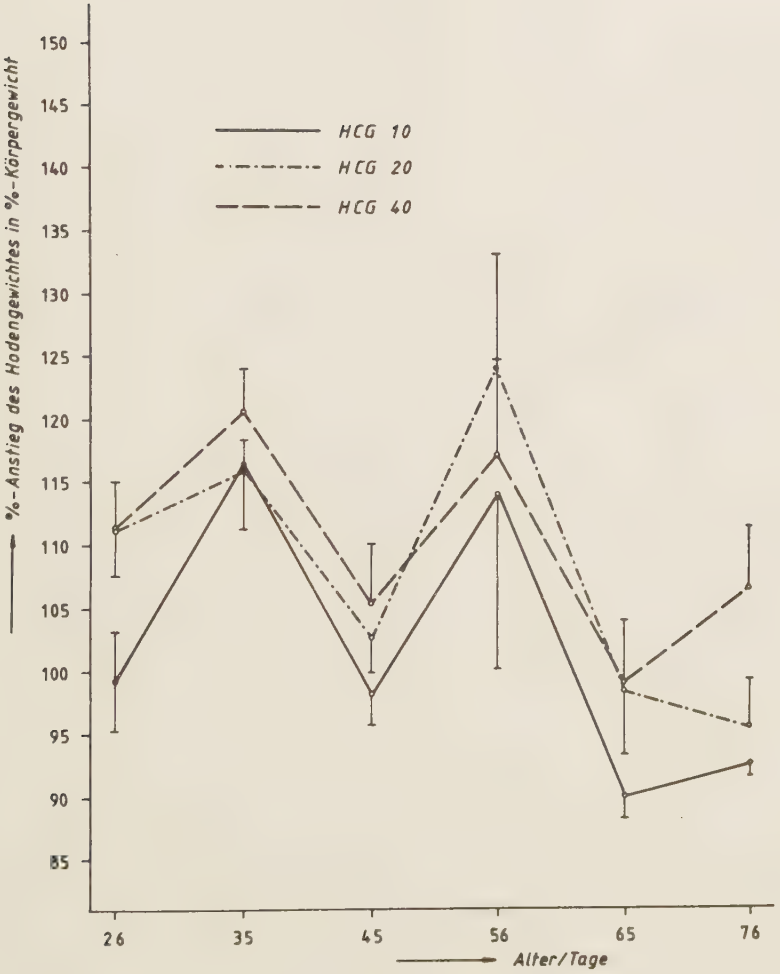


Abb. 11a: Prozentuale Veränderung des GSI bei unterschiedlicher HCG-Stimulation in Abhängigkeit vom Alter

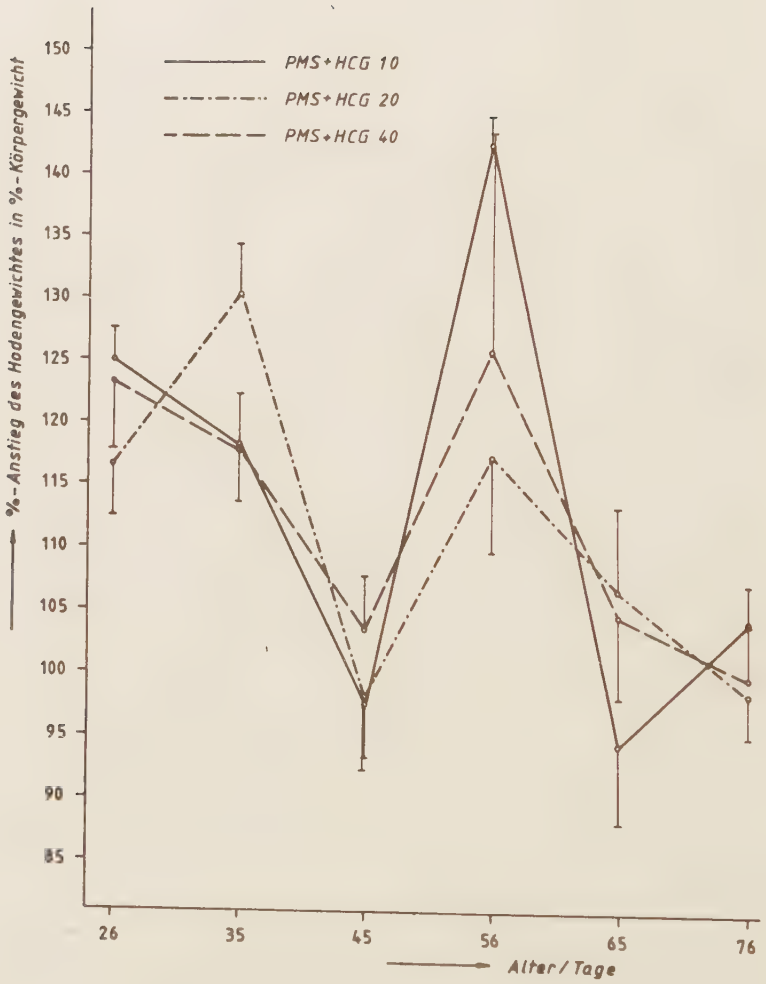


Abb. 11b: Prozentuale Veränderung des GSI bei unterschiedlicher HCG-Stimulation und gleichbleibender PMS-Vorbehandlung in Abhängigkeit vom Alter

Tabelle IV: Werte des Quotienten $\frac{\text{Gonadenwert}}{\text{Körpergewicht}} \times 100$ = Gonosomatischer Index (GSI); Mittelwerte $\pm s_{\bar{x}}$

	26 Tage	35 Tage	45 Tage	56 Tage	65 Tage	76 Tage
Kontrolle.	1,20±0,08	1,50±0,07	1,90±0,05	1,68±0,27	2,34±0,17	2,62±0,19
HCG 10	1,19±0,05	1,75±0,08	1,86±0,05	1,91±0,23	2,11±0,05	2,43±0,03
HCG 20	1,33±0,04	1,74±0,04	1,95±0,05	2,09±0,15	2,3±0,12	2,5±0,1
HCG 40	1,34±0,04	1,81±0,05	2,0±0,08	1,97±0,13	2,31±0,12	2,79±0,13
PMS+HCG 10	1,50±0,03	1,77±0,06	1,85±0,08	2,39±0,04	2,21±0,14	2,73±0,08
PMS+HCG 20	1,40±0,05	1,95±0,06	1,87±0,11	1,97±0,13	2,49±0,16	2,58±0,09
PMS+HCG 40	1,48±0,07	1,76±0,06	1,97±0,08	2,11±0,3	2,44±0,15	2,61±0,11

Tabelle V : GSI-Werte, prozentuale Veränderung; Mittelwerte $\pm s_{\bar{x}}$

	26 Tage	35 Tage	45 Tage	56 Tage	65 Tage	76 Tage
HCG 10	99,06 $\pm$ 3,95	116,43 $\pm$ 5,23	98,03 $\pm$ 2,42	113,99 $\pm$ 13,84	89,96 $\pm$ 1,92	92,56 $\pm$ 0,95
HCG 20	111,04 $\pm$ 3,71	115,89 $\pm$ 2,46	102,76 $\pm$ 2,81	124,11 $\pm$ 9,22	98,29 $\pm$ 4,94	95,42 $\pm$ 3,82
HCG 40	111,25 $\pm$ 3,68	120,78 $\pm$ 3,58	105,27 $\pm$ 4,38	117,11 $\pm$ 7,77	98,83 $\pm$ 5,12	106,49 $\pm$ 4,96
PMS+HCG 10	125 $\pm$ 2,46	118,22 $\pm$ 3,99	97,37 $\pm$ 4,18	142,11 $\pm$ 2,23	94,34 $\pm$ 6,10	104,01 $\pm$ 2,86
PMS+HCG 20	116,56 $\pm$ 4,08	130,22 $\pm$ 4,01	98,16 $\pm$ 5,85	117,11 $\pm$ 7,77	106,41 $\pm$ 6,63	98,38 $\pm$ 3,27
PMS+HCG 40	123,13 $\pm$ 5,43	117,67 $\pm$ 4,01	103,42 $\pm$ 4,16	125,6 $\pm$ 17,61	104,27 $\pm$ 6,40	99,52 $\pm$ 4,3

V. DISKUSSION

Bei der altersabhängigen Betrachtung der endogenen Serum-Testosteron-Werte, der nicht mit Gonadotropinen stimulierten Kontrolltiere, ist soweit beurteil- und vergleichbar, eine gute Übereinstimmung mit den Werten von Moger (20) und für präpubertäre und pubertäre Ratten mit den Werten von Odell/Swerdloff (24), Miyachi (18), Resko (32), und Parlow (28) festzustellen. Ein Maximum war in dieser Arbeit bei 65 Tage alten Ratten zu erkennen, was größenordnungsmäßig mit dem Kontrollwert für adulte Ratten bei Amatayakul (1), Grota (5) und Knorr (12) übereinstimmt, während Lee et al. Spitzenspiegel zwischen 70 und 80 Tagen erreichten (15) und Podesta/Rivarola gar bei 90 Tagen (29), was an der unterschiedlichen Rattenart bzw. an den unterschiedlich zusammengestellten Altersgruppen bzw. an Einzelbestimmungen liegen könnte. Weiterhin wurden für die 76-tägigen im Vergleich zu den 65-tägigen abnehmende Werte gemessen; dies könnte vom Trend her u.a. von Miller/Riegle (17) und Lloyd (16) bestätigt werden.

Bei den mit HCG behandelten Tieren waren sämtliche Serum-Testosteron-Werte signifikant erhöht. Es waren, unabhängig von der applizierten Gonadotropin-Dosis, mit zunehmendem Alter ansteigende Werte zu beobachten, deren Maximum ebenfalls bei den 65 Tage alten Tieren festzustellen war. Auch bei Gupta et al. (7) zeigten die Hoden von intakten männlichen Ratten verschiedenen Alters, nach LH Applikation, mit zunehmender Reife, Veränderungen in der Empfindlichkeit dahingehend, daß mit höherem Alter die Plasma-Testosteronzunahme größer war. Die Maximalwerte der Serumerte für Testosteron + DHT nach LH Applikation werden bei Moger (20), für die 60 Tage alten Ratten angegeben. Ebenso waren - bei dem gleichen Autor in einer anderen Studie - die peripheren Testosteron-plus DHT-Werte bei 76-tägigen Ratten nach LH Applikation, etwa 5 bis 6 mal höher als bei 33 Tage alten (19). Diese signifikant höheren Serum-Testosteronspiegel, die nach LH-Behandlung in erwachsenen Ratten gefunden werden, zeigen an, daß die Veränderungen der Hoden in der Antwort auf LH ein wichtiger Teil der Pubertät in der männlichen Ratte sein können. Zum Teil erhebliche periphere Testosteronerhöhungen bei männlichen Ratten nach LH, Ratten-LH und HCG-Verabreichungen werden zusätzlich von mehreren Autoren bestätigt , (3, 13, 24, 25,

28, 31), während Boyer et al., Judd et al. bei pubertären Menschen eine geschlossene zeitliche Beziehung zwischen den nächtlichen LH- und Testosteronspiegeln herausfanden, was Anlaß für die Vermutung ist, daß die Leydig-Zellen sofort auf LH antworten; dahingegen fand Santen, daß Injektionen von pharmakologischen LH-Dosen in gesunden Männern nur einen schrittweisen Anstieg des mittleren Testosteron-Spiegels hervorrufen (2). Im Gegensatz zu den beschriebenen Ergebnissen konnten Singal und Gomes keinen signifikanten Unterschied zwischen den Testosteron-Spiegeln der Kontrolltiere und denen der HCG-behandelten Ratten innerhalb einer jeden Altersgruppe feststellen, was jedoch durch sehr unterschiedliche Versuchsbedingungen zu erklären ist (37).

Außerdem zeigten Miller und Riegle auf, daß im Vergleich von 3 Monate alten Ratten zu 20 Monate alten Ratten, die älteren - nach intravenöser HCG-Stimulation - einen niedrigeren Testosteron-Spiegel und eine reduzierte Hodenantwort auf akute Gonadotropin-Stimulation haben (17).

Dieser Trend könnte die in der vorliegenden Arbeit etwas niedrigeren Werte der 76 tägigen Ratten gegenüber den 65 tägigen erklären.

Betrachtet man den prozentualen, altersabhängigen Verlauf der HCG-Stimulation, so sieht man, unabhängig von der HCG-Dosis, zwischen den 26 tägigen und den 35 und 45 tägigen Ratten einen signifikanten Anstieg des Serum-Testosterons auf über 3000 % bis über 5000 %. Dieser Trend des stärksten prozentualen Testosteronsanstiegs zwischen präpubertären und pubertären Ratten scheint - soweit überhaupt in den Daten vergleichbar - von Moger (20) und Odell (24) bestätigt zu werden. In einer anderen Studie von Odell wird ebenso für mehrere unterschiedliche LH-Dosen-Applikationen bestätigt, daß der prozentuale Anstieg des Serum-Testosterons im Alter zwischen 21 und 41 Tagen wesentlich größer ist als im Alter zwischen 41 und 62 Tagen (25).

Eine Erklärung dafür könnte sein, daß zwischen 28. und 49. Tag ein FSH-Serum-Gipfel erreicht wird - (wie in mehreren Studien bestätigt) - (15), und FSH die Sensibilität der Hoden für LH vergrößert, d.h. die Rolle des FSH ist LH unterstützend (4, 7, 25). Ebenso scheint es, daß unter FSH-Einfluß während der sexuellen Reifung

neue Rezeptoren für LH entstehen. Es ist jedoch noch nicht zu unterscheiden, ob eine erhöhte Anzahl von Rezeptoren an existierenden Leydig-Zellen oder Ausbildung von zusätzlichen Leydig-Zellen oder die Entwicklung von neuen LH-Rezeptoren in irgendeinem Teil des Hodens entstehen (25). Bei Gupta et al. wird ebenso von der Übereinstimmung der hohen Sensibilität der Hypophysendrüse auf Hypothalamus-Hormone mit den zugenommenen Sexualsteroid-Konzentrationen berichtet, die bei der männlichen Ratte zwischen dem 25. und 33. Alterstag erreicht werden, und mit dem Beginn der in diesem Zeitraum ablaufenden Leydig-Zell-Differenzierung in Zusammenhang stehen (6). Weiterhin zeigt Gupta et al. in einer anderen Studie mit Langzeituntersuchungen beim Menschen auf, daß die höchste Zunahme in der Plasmakonzentration und Urinausscheidung von Testosteron in den Jahren 12 - 14 zu erkennen ist, und daß die zunehmenden Testosteron- und LH-Spiegel gut mit den Reifungsentwicklungsstadien und mit der Leydig-Zellenreifung korrelieren (10).

Es konnten in der vorliegenden Arbeit - mit einer Ausnahme bei den 76 tägigen Ratten zwischen HCG 10 und HCG 20-Dosis - keine signifikanten Dosisabhängigkeiten in den verschiedenen Altersgruppen festgestellt werden. Es scheint jedoch, daß überwiegend der Trend zu einer Zunahme der Testosteron-Produktion entsprechend höheren HCG-Dosen besteht und daß vielleicht eine optimale Testosteron-Produktion mit einer HCG-Dosis zwischen 20 I.U. und 40 I.U./100 g. KG erreicht wird. Die relativ wenigen und sehr lückenhaft bestehenden Daten bezüglich einer Dosisabhängigkeit von LH bzw. Ratten-LH in verschiedenen Altersstufen stimmen im Trend mit den vorliegenden überein. So zeigte Moger auf, daß sich bei 33 tägigen Ratten kein signifikanter Unterschied nach 10 µg und 30 µg LH/100 g KG-Stimulation für die periphere Testosteron + DHT-Fraktion ergab (20). Auch in einer anderen Studie des gleichen Autors sind keine dosisabhängigen, signifikanten Testosteronspiegelunterschiede innerhalb der einzelnen Altersgruppen nach unterschiedlichen LH-Applikationen beschrieben. Es scheint jeoch bei der jüngeren Gruppe (36 Tage alt) eine maximale Stimulation der Testosteron-Produktion nach 10 µgLH/100 g KG-Dosis zu bestehen, ansonsten besteht auch hier der Trend, daß mit höheren LH-Dosen höhere Testosteron-Spiegel innerhalb einer Altersgruppe festgestellt wurden (19). Bei Parlow et al. ergab sich für 27 tägige Holtzmann-

Ratten eine Dosis-Antwort-Beziehung zwischen der Serum-Testosteron-Konzentration und den intravenös verabreichten Ratten-LH-Dosen von 0,15 - 8 µg/100 g KG; signifikante Unterschiede wurden nicht beschrieben (28); auch in einer Studie von Odell/Swerdloff wird auf eine Dosisabhängigkeit des Testosteronspiegels auf unterschiedliche LH-Applikationen nicht eingegangen. Anhand der vorliegenden Daten besteht auch hier der Trend, daß mit höheren LH-Dosen höhere Serum-Testosteron-Werte pro Altersgruppe erreicht werden (24).

Neben der alleinigen HCG-Behandlung interessierte uns die Beeinflussung der Testosteron-Produktion durch zusätzliche, 2-tägig vorausgehende, konstantbleibende PMS-Applikation in unterschiedlichen Altersgruppen. Unabhängig von der HCG-Dosis nahm der periphere Testosteronspiegel mit dem Alter - zum Teil - gewaltig zu. So konnte - prozentual betrachtet - ein erster, steiler Anstieg zwischen ca. 1700 % bis knapp 4000 % bei unterschiedlichen HCG-Dosen für die 56 tägigen gemessen werden. Diese Werte unterscheiden sich signifikant von denen bei 45 Tage alten Ratten. Die Maximalwerte wurden jedoch für die 75 tägigen gemessen, die zwischen 6000 % bis zu 20000 % unter zusätzlicher FSH-Aktivität zunahmen. Diese Daten legen nahe, daß sich die PMS-Vorbehandlung effektiver in der Zunahme des Serum Testosterons auswirkt, wenn das Tier älter ist. So berichtet auch Odell et al., daß die FSH-Induktion auf die LH-Empfindlichkeit ein Faktor in der sexuellen Reifung in der männlichen Ratte sein könnte, und daß die testikuläre Antwort mit Testosteron auf LH-Stimulation eindrucksvoll mit dem Alter zunimmt, also ein zeitabhängiger Effekt des FSH auf die testikuläre Antwort nach LH besteht (24, 25). Auch Gupta et al. kommt zu ähnlichen Ergebnissen, in denen er über eine zunehmende altersabhängige Endorgan-Empfindlichkeit als Folge der FSH-Exposition berichtet und dies als eventuelle Hauptdeterminante der männlichen Pubertät ansieht. Auch bei Sizonenko et al. wird berichtet, daß nach konstanter HCG-Applikation an Kinder in verschiedenen Pubertätsstadien eine direkte Korrelation zwischen der Zunahme an Serum-Testosteron und Pubertätsstadium, sowie auch der FSH-Konzentration besteht (38). Also wird die Antwort auf LH durch die FSH-Expositionszeit und vielleicht auch von der FSH-Dosis bestimmt (25).

Diese Beobachtung der Potenzierung der LH-Wirkung durch Ovine-FSH konnten, im Gegensatz zu den obigen Meinungen, Krause und

Schwaebe nicht bestätigen, was sie auf die unphysiologische Struktur des Ovine-FSH zurückführen (13).

Die Frage der HCG-Dosisabhängigkeit unter gleichbleibender PMS-Stimulation war nicht eindeutig zu klären. So konnten zwar mit höheren HCG-Dosen meist höhere Testosteron-Spiegel erreicht werden, jedoch war auffallend, daß für die jüngste und die drei ältesten Gruppen für die PMS + HCG 20 Dosis zum Teil signifikant niedrigere Werte als für die PMS + HCG 10 bzw. PMS + HCG 40 Dosen erreicht wurden. Ebenso interessant war beim Vergleich der alleinigen HCG-Stimulation zur PMS + HCG-Stimulation die Tatsache, daß - unabhängig von der HCG-Dosis - bei den 26-, 35- und 45 tägigen, bis auf einen Wert, alle Testosteronwerte signifikant tiefer lagen, als bei alleiniger äquivalenter HCG-Behandlung. In diesen Altersgruppen scheint also die durch alleinige HCG-Stimulation erzielte Testosteronproduktion mittels FSH-Aktivitäten eher gebremst zu werden, während bei den drei älteren Gruppen, unter PMS-Vorbehandlung, unabhängig von der HCG-Dosis, signifikant höhere Testosteronspiegel als bei alleiniger HCG-Stimulation erreicht wurden. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß zusätzlich zum Feedback zwischen Hoden und Hypophyse "short feedback"-Mechanismen existieren; so inhibieren die Gonadotropine ihre eigene Freisetzung und dieser Inhibitionsmechanismus ist wahrscheinlich im Hypothalamus lokalisiert. Es existiert auch der Beweis, daß exogene oder nicht hypophysäre Gonadotropine ebenso den "short feedback" und so die Verringerung ihrer Releasing-Hormone stimulieren können. So erniedrigte die Verabreichung von Ovine-FSH bzw. HCG oder PMS den endogenen FSH-Spiegel der behandelten Ratten meist auf unmeßbar niedrige Werte. Bei den morphologischen und biochemischen Substraten handelt es sich um einen im Hypothalamus lokalisierten Mechanismus, welcher durch die Aktivierung einer Protease durch Gonadotropine zu einer Verringerung des Releasing-Hormons führt. Es ist möglich, daß in diesen Experimenten auch die LH-Spiegel gedrückt werden (13, 33). Kombiniert man diesen "short-feedback"-Mechanismus mit der erhöhten Empfindlichkeit der Hypothalamus-Hypophysen-Achse (7, 9, 25, 30) bei unreifen Tieren, so kann man von der Vorstellung ausgehen, daß es durchaus zu solchen signifikant niedrigeren Testosteronwerten bei den 26-, 35- und 45 tägigen Ratten kommt, als bei der alleinigen einmaligen HCG-Stimulation.

Neben den obenstehenden Betrachtungen wurden zusätzlich noch die Quotienten aus A-Diol und DHT (= 5 α reduzierte Folgeprodukte des Testosterons) zu Testosteron gebildet. Die Veränderung dieses Profils wird als Maß der Biokonversion des Testosterons in 5 α - reduzierte Folgeprodukte angesehen.

Das Normalprofil der Kontrolltiere zeigte, daß der Bruch bei den unreifen Gruppen größer war als in den restlichen Altersgruppen, d.h., daß sich mit zunehmendem Alter das Verhältnis zugunsten des Testosterons veränderte. Dementsprechend nimmt die 5 α- Reduktase-Aktivität bezüglich Testosteron mit höherem Alter ab. Der Bruch wird im Alter zwischen 45 und 56 Tagen ≤ 1, das entspricht dem Zeitraum, in dem weniger 5 α -reduzierte Metaboliten als Testosteron gebildet werden, was andeutet, daß bei unreifen Gruppen periphere 5 α -reduzierte Metaboliten eine physiologische Wichtigkeit besitzen könnten.

Auch bei Moger war der Diol/Testosteron + DHT-Bruch für die 20 und 35 tägigen signifikant größer als in anderen Altersstufen, was die Vermutung der physiologischen Wichtigkeit von A-Diol bestätigt, und weiterhin, daß A-Diol eines der testikulären Komponenten in der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse in der unreifen Ratte ist (20). Neben Gupta et al. zeigten zusätzlich auch andere Autoren auf, daß zu Beginn der Pubertät eine Zunahme der 5 α - Reduktase stattfindet und daß die 5 α - Reduktase eine regulatorische Rolle im sexuellen Reifungsprozeß spielt (3, 10, 29), wohingegen während der Pubertät und bei erwachsenen männlichen Ratten Testosteron zum Hauptprodukt und die Bildung von 5 α - A-Diol bzw. von 5 α - reduzierten C_{19}-Steroiden stark verringert wird (3, 21).

Die Diol + DHT zu Testosteron-Quotienten verhielten sich nach alleiniger HCG-Stimulation im Vergleich zu den für die Kontrolltiere ermittelten Quotienten dahingehend anders, daß bereits bei der jüngsten Gruppe das Verhältnis < 1 war. Dementsprechend lag eine relativ größere Testosteronproduktion nach HCG-Applikation als bei den Kontrolltieren im vergleichbaren Alter vor. Es trat also durch den HCG-Stimulus eine Aktivitätssteigerung nicht nur für die 5 α -Reduktase alleine ein, sondern auch für Enzyme, welche die Testosteronproduktion ankurbeln (3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, Desmolase u.a.), so daß der Testosteronanfall größer als die entsprechende Testosteronreduktion war.

Durch die 2-tägige vorausgehende Vorbehandlung ergab sich für das Quotienten-Profil - unabhängig von der HCG-Dosis - bei den drei jüngsten Gruppen keine so eindeutige Verschiebung zugunsten des Testosterons, wie bei alleiniger HCG-Stimulation. Im Gegenteil, hier schien sich die - im Vergleich zur alleinigen HCG-Stimulation - verminderte Testosteronproduktion dahingehend auszuwirken, daß in der Relation die 5 α -reduzierten Folgeprodukte für die 26- und 35 tägigen einen Quotienten $>$ 1 erbrachten (41), die jedoch noch deutlich unter dem Quotientenprofil der entsprechenden Kontrolltiere lagen. Ab Tag 45 wurde jedoch der Quotient $\leq$ 1, was den entsprechend größeren Testosteronanfall widerspiegelte, und für die drei ältesten Gruppen ergaben sich sogar Brüche, die wesentlich kleiner waren als die der vergleichbaren Altersgruppen bei alleiniger HCG-Stimulation.

Eine Erklärung dafür könnte sein, daß bei den beiden jüngsten Gruppen die 5 α - Reduktase weniger stark gehemmt wird als die für den Testosteronaufbau benötigten metabolischen Enzymsysteme, während sich für die drei ältesten Gruppen aufgrund der geringeren Empfindlichkeit im Hypothalamus-Hypophysen-Bereich - einschließlich der Überlegung des "short-feedback"-Mechanismus - eine zusätzliche Steigerung der HCG-induzierten Testosteronproduktion durch FSH-Potenzierung der HCG-Wirkung ergab. Hinzu kommt noch, daß im unreifen Rattenhoden die 5 α -Reduktase-Aktivität durch FSH und LH stimuliert wird, im reifen Rattenhoden jedoch nur LH auf die gleiche Enzymaktivität stimulierend wirkt (21).

Bei der Betrachtung der altersabhängigen Veränderungen der Hodengewichte - ausgedrückt als Gonosomatischer Index (=GSI)
$= \frac{\text{Gonadenwert}}{\text{Körpergewicht}} \times 100$ - ergab sich mit zunehmendem Alter mit und ohne HCG-Stimulation bzw. noch zusätzlicher PMS-Vorbehandlung die Tendenz der Zunahme.

So ergaben sich bei den Kontrolltieren zwischen den 26 und 35 Tage alten Tieren als auch zwischen den 35 und 45 Tage alten Tieren signifikante Hodengewichtsunterschiede. Dies steht gut im Einklang mit den Ergebnissen von Gupta (8), der die stärkste Zunahme des Hodengewichtes in der Zeit zwischen dem 39. und 49. Tag feststellt und den Ergebnissen von Swerdloff et al. (39), der die größte Hodengewichtszunahme zwischen dem 21. und 49. Tag ermittelt; das

entspricht der Zeit, in der die männliche Gametenproduktion einsetzt. Bestätigt werden diese Ergebnisse auch durch Moger (19), der für 31 Tage alte Ratten mit $725^{+}32$ mg beträchtlich geringere Hodengewichte feststellt, im Vergleich mit den Werten von Swerdloff für 49 Tage alte Ratten, die 2000 mg Hodengewicht hatten. Ebenso stimmt der Verlauf der GSI-Werte bei unbehandelten, intakten Tieren mit den von Gupta berichteten Ergebnissen im Großen und Ganzen überein, wobei jedoch in Guptas Arbeit ein Maximum für die 60 Tage alten Ratten erreicht wird (8), während das Maximum in der vorliegenden Arbeit für die älteste Gruppe (76 Tage) festgestellt wurde.

Auffallend war außerdem, daß neben den Kontrolltieren im Alter von 26 bis 35 Tagen signifikante Unterschiede bei allen Dosierungseinheiten im gleichen Alter gemessen wurden, was ebenso der erhöhten Ansprechbarkeit bezüglich der Gametenbildung in diesem Alter entsprechen dürfte.

Beim Vergleich des prozentualen Verlaufs der GSI-Werte ergab sich ein noch exakteres Bild bezüglich der altersabhängigen Hodengewichtsveränderungen. Hier ist auffallend, daß lediglich für HCG 10 und PMS + HCG 20 ein signifikanter Zuwachs zwischen den 26- und 35 tägigen zu sehen war, wohingegen die 45 tägigen in allen Dosierungseinheiten signifikant niedriger als die 35 tägigen lagen, so daß man davon ausgehen kann, daß die Gametenproduktion unter den gegebenen Versuchsbedingungen im prozentualen, altersabhängigen Vergleich am stärksten für die 35 tägigen angekurbelt wurde.

Bei der dosisabhängigen Betrachtung der Hodengewichte ergaben sich lediglich für die 26- und 35 tägigen Tiere eindeutige Signifikanzen. So zeigte sich, daß für die jüngste Gruppe (26 Tage) unter HCG 40 sowie alle PMS-vorbehandelten Tiere und für die 35 tägigen für alle Dosierungseinheiten signifikant höhere Hodengewichte gegenüber den Kontrolltieren gemessen wurden. Auch war für die jüngsten unter HCG 20-Stimulation ein signifikant höheres Hodengewicht im Vergleich zur HCG 10-Stimulation zu erkennen, als auch für die 35 tägigen zugunsten von PMS + HCG 20 gegenüber PMS + HCG 10. Dies zeigt, daß die Gametenproduktion noch am ehesten bei den beiden jünsten Gruppen durch HCG-Stimulation bzw. zusätzliche PMS-Vorbehandlung beeinflußbar, als auch in zwei Fällen dosisabhängig war.

Singal und Gomes hingegen konnten beim Vergleich der Kontroll- zu den HCG-behandelten Tieren in jedem Alter keinen signifikanten Unterschied im Körper- und im Hodengewicht durch die HCG-Stimulation feststellen (37). Kremers, Tixhon jedoch beobachteten an erwachsenen Ratten nach HCG-Verabreichung keine signifikanten Hodengewichtsveränderungen, was unsere Werte für diese Altersgruppe bestätigt (14), während Odell, Swerdloff über eine Zunahme des Hodengewichtes bei reifen und unreifen Ratten 5 Tage nach Hypophysektomie nach Behandlung mit reinem FSH berichten (25), was zum Teil den Trend der vorliegenden Werte bestätigt.

Beim Vergleich der Hodengewichtsveränderungen bei alleiniger HCG-Stimulation zur zusätzlichen PMS-Vorbehandlung ergab sich für die 26- und 76 tägigen ein signifikanter Zuwachs für PMS + HCG 10 gegenüber HCG 10, und für die 45 tägigen ein signifikanter Unterschied zugunsten von PMS + HCG 20 gegenüber der alleinigen HCG 20-Stimulation. Diese Ergebnisse bei unterschiedlichen Dosierungen, sowie bei unreifen, pubertären und reifen Ratten müßten durch zusätzliche Versuche genauer abgeklärt werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit befaßte sich mit der Veränderung der Hodenantwort auf Gonadotropinstimulation während der sexuellen Reifung. Bei sechs verschiedenen Altersgruppen (26 bis 76 Tage) von männlichen Wistar-Ratten wurden Auswirkungen von unterschiedlichen HCG-Dosierungen - 10, 20 und 40 I.E. HCG pro 100 g Körpergewicht - auf den Hoden untersucht. Eine Gruppe dieser Tiere wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit je einer konstantbleibenden PMS-Dosis, entsprechend 10 I.E. PMS pro 100 g Körpergewicht, behandelt und am dritten Tag mit jeweils unterschiedlichen HCG-Dosen (10, 20 und 40 I.E. pro 100 g KG) zusätzlich stimuliert. Die Auswirkung dieser Gonadotropinbehandlung wurde sowohl anhand der Serum-Konzentration von Testosteron, 5α-Dihydrotestosteron und 5α-Androstandiol radioimmunologisch gemessen (41), als auch an Veränderungen des Hodengwichtes untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Die Antwort des Hodens veränderte sich auf HCG-Verabreichung mit zunehmender Reifung.

2. Die Antwort des Hodens auf HCG drückte sich bei unreifen Tieren in den höheren Werten von 5α-reduzierten Metaboliten aus, wohingegen bei reifen Tieren Testosteron die Hauptkomponente bildete.

3. Die Antwort des Hodens war auf unterschiedliche Gonadotropinstimulation vom Trend her dosisabhängig.

4. Eine PMS-induzierte testikuläre Empfindlichkeit war eher bei den reifen Tieren zu sehen.

5. PMS bremste bei jüngeren Ratten eher die durch alleinige HCG-Stimulation bewirkte Testosteronproduktion.

6. Die Hodengewichte (GSI-Werte) hatten mit zunehmendem Alter mit und ohne HCG-Stimulation bzw. nach zusätzlicher PMS-Vorbehandlung die Tendenz der Zunahme, wobei die Beeinflussung der Gametenproduktion als auch eine gewisse Dosisabhängigkeit am ehesten bei den beiden jüngsten Gruppen gegeben war.

Somit ist die Änderung der testikulären Empfindlichkeit auf Gonadotropine vielleicht ein anderer Hauptfaktor für den Beginn der Pubertät.

VII. LITERATURLISTE

1) Amatayakul Kosin, Robert Ryan, Tohru Uozumi and Alexander Albert, A reinvestigation of testicular-anterior pituitary relationships in the rat: I. Effects of castration and cryptorchidism.
Endicronology 88, 872, 1971

2) Baker H.W.G., R.J. Santen, H.G. Bürger, D.M. de Krester, B. Hudson, R.J. Pepperell and C.W. Bardin
Rhythms in the secretion of gonadotropins and gonadol steroids
Journal of Steroid Biochemistry 6, 793-801, 1975

3) Chan S.W.C., J.H. Leathem and T. Esashi
Testicular metabolism and serum testosterone in aging male rats
Endocrinology 101, 128, 1977

4) Döhler K.D., and W. Wuttke
Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepubertal male and female rats.
Endocrinology 97, 898, 1975

5) Grota L.J.
Effects of age and experience on plasma testosterone
Neuroendocrinology 8, 136-143, 1971

6) Gupta D. and M. Eichner
Age related changes in pituitary responsiveness to luteinng hormone-releasing hormone in the male rat
Research in Experimental Medicine 170, 289-293, 1977

7) Gupta D. and M. Eichner
An appraisal of the male hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis in the rat during sexual maturation
Hypothalamic Hormones - Chemistry, Physiology and Clinical Applications. Editors : Gupta / Voelter, Verlag Chemie, Weinheim-New York, 1978, S. 257-285

8) Gupta D.
Endocronological data in experimental cryptorchidism in the rat

9) Gupta D., K. Rager, J. Zarzycki and M. Eichner
Levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone and dihydrotestosterone in the circulation of sexually maturing intact male rats and after orchidectomy and experimental bilateral cryptorchidism
J. Endocr. 66, 183-193, 1975

10) Gupta D., K. Rager, A. Attanasio, W. Klemm and M. Eichner
Sex steroid hormones during multiphase pubertal developments
J. Steroid Biochem. 6, 859-868, 1975

11) Inano H. and Bun-Ichi Tamaoki
Bioconversion of steroids in immature rat testes in vitro
Endocrinology 79, 579, 1966

12) Knorr D.W., T. Vanha-Perttula and M. Lipsett
Structure and function of rat testis through prubescene
Endocrinology 86, 1298, 1970

13) Krause W. and P. Schwaebe
FSH and testosterone levels in the plasma of juvenile male rats after application of ovine FSH, HCG and PMS at different ages
Endokrinologie 68, 22-26, 1976

14) Kremers P., Ch. Tixhon and J. Gielen
17 α-hydroxylase and testosterone biosynthesis in rat testes
Journal of Steroid Biochemistry 8, 873-877, 1977

15) Lee V.W.K., D.M. de Krester, B. Hudson and C. Wang
Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity
J. Reprod.Fert. 42, 121-126, 1975

16) Lloyd B.J.
Plasma testosterone and accessory sex glands in normal and cryptorchid rats
J. Endocr. 54, 285-296, 1972

17) Miller Anna E., M S , and Gail D. Riegle, Ph D
Serum testosterone and testicular response to HCG in young and aged male rats
Journal of Gerontology 33, 197-203, 1978

18) Miyachi Yukitaka, Eberhard Nieschlag and Mortimer Lipsett
The secretion of gonadotropins and testosterone
Endocrinology 92, 1, 1973

19) Moger W.H. and D.T. Armstrong
Changes in serum testosterone levels following acute LH treatment in immature and mature rats
Biology of Reproduction 11, 1-6, 1974

20) Moger W.H.
Serum 5α-androstane-3α, 17β-diol, androsterone, and testosterone concentrations in the male rat. Influence of age and gonadotropin stimulation
Endocrinology 100, 1027, 1977

21) Nayfeh Shihadeh N., James C. Coffey, Vidar Hannon and Frank S. French
Maturational changes in testicular steroidgenesis: Hormonal regulation of 5α-reductase
Journal of Steroid Biochemistry 6, 329-335, 1975

22) Negro-Vilar A., S.R. Ojeda and S.M. Mc. Cann
Evidence for changes in sensitivity to testosterone negative feedback on gonadotropin release during sexual development in the male rat
Endocrinology 93, 729, 1973

23) Odell W.D., R.S. Swerdloff, H.S. Jacobs and M.A. Hescox
FSH induction of sensitivity to LH: One cause of sexual maturation in the male rat
Endocrinology 92, 160, 1973

24) Odell W.D., R.S. Swerdloff, J. Bain, F. Wollesen and P.K. Grover
The effect of sexual maturation on testicular response to LH stimulation of testosterone secretion in the intact rat
Endocrinology 95, 1380, 1974

25) Odell W.D., R.S. Swerdloff
The role of testicular sensitivity to gonadotropins in sexual maturation of the male rat
Journal of Steroid Biochemistry 6, 853-857, 1975

26) Ojeda S.R. and V.D. Ramirez
Plasma level of LH and FSH in maturing rats: Response to hemigonadectomy
Endocrinology 90, 466, 1972

27) Ojeda S.R. and V.D. Ramirez
Short-term steroid treatment on plasma LH and FSH in castrated rats from birth to puberty
Neuroendocrinology 13, 100-114, 1973

28) Parlow A.F., J. Coyotupa and Nada Kovacic
The sequence of changes in prepubertal male rat serum testosterone following intravenous injection of rat LH
J. Reprod. Fert. 32, 163-165, 1973

29) Podesta Ernesto J. and Marco A. Rivarola
Concentration of androgens in whole testis, seminiferous tubules and interstitial tissue of rats at different stages of development
Endocrinology 95, 455, 1974

30) Ramirez V.D. and S.M. Mac Cann
Inhibitory effect of testosterone on luteinizing hormone secretion in immature and adult rats
Endocrinology 76, 412, 1965

31) Repcekova Daniela and L. Mikulaj
Plasma testosterone of rats subjected to immobilization stress and/or HCG administration
Hormone Res. 8, 51-57, 1977

32) Resko J.A., H.H. Feder and R.W. Goy
Androgen concentrations in plasma and testis of developing rats
J. Endocr. 40, 485-491, 1968

33) Saxena A.
Gonadotropin inhibitory factors (G I F) in rats
Endocrin. exp. 7, 69-74, 1973

34) Shikita Mikio and Peter Hall
The action of HCG in vivo upon microsomal enzymes of immature rat testis
Biochim. Biophys. Acta 136, 484-497, 1967

35) Shoen E.J. and L.T. Samuels

Acta Endocrinol. 50, 365, 1965

36) Silbernagel S. and A. Despopoulos
Androgene
Taschenatlas der Physiologie 1. Aufl.
Thieme Verlag Stuttgart 1979 S. 250

37) Singal S.P. and W.R. Gomes
Effects of normal blood androgens and exogenous HCG on body weight and testes weight in growing rats
Indian J. Med. Res. 66, 597-601, 1977

38) Sizonenko Pierre C., Antoine Cuendet and Luc Paunier
FSH. I. Evidence for its mediating role on testosterone secretion in cryptorchidism
J. Clin. Endocrinol. Metab. 37, 68, 1973

39) Swerdloff R.S., P.C. Walsh, H.S. Jacobs and W.D. Odell
Serum LH and FSH during sexual maturation in the male rat: Effect of castration and cryptorchidism
Endocrinology 88, 120, 1971

40) Tamm, J.
Testis
Klinische Pathophysiologie, Hrsg.: W. Siegenthaler
Thieme Verlag Stuttgart 1973, S. 347-369

41) Zais, Roland
Veränderungen der 5α-reduzierten Metaboliten von Testostron nach HCG-Stimulation und PMS-Vorbehandlung in Ratten während der geschlechtlichen Reife
Dissertation, Universitätsklinik Tübingen 1980

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Gupta danke ich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung während meiner Arbeit in seinem Labor.

Lebenslauf

1950 :	28. 11. geb. in Lindau(Bodensee) Vater: Siegfried Bucher, Kaufmann Mutter: Pauline Bucher, geb. Pfauth
1957-61 :	Volksschule in Lindau
1961-70 :	Math.-Naturw. Gymnasium in Lindau
1970 :	Abitur
1970-71 :	Philosophie und Geschichte an der Univ. Würzburg.
1971-72 :	Ersatzdienst im Psychiatrischen Landeskrankenhaus Emmendingen.
1972-73 :	Medizin an der Universität Hohenheim
1973-78 :	Medizin ander Universität Tübingen
1975 :	Ärztliche Vorprüfung
1976 :	I. Ärztliche Prüfung
1978	II. Ärztliche Prüfung
1978-79 :	Praktisches Jahr am Katharinenhospital in Stuttgart
25.10. 1979 :	III. Ärztliche Prüfung
1980-81 :	Assistenzarzt an der Chir. Abteilung des Hafenkrankenhauses in Hamburg
1981 :	Kursus der Tropenmedizin und medizinischen Parasitologie am Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg (Diplom)

Seit April 1982 Assistenzarzt an der Urolog. Abteilg. des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf

Druck Köhler Tübingen